

Chimäre Antikörperperfusionsproteine zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich 14

der Johann Wolfgang Goethe-Universität

in Frankfurt am Main

von

Benjamin Dälken

aus Georgsmarienhütte

Frankfurt 2005

(DF1)

Vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften (FB 14) der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Harald Schwalbe

Gutachter: Prof. Dr. Winfried Wels
Prof. Dr. Bernd Ludwig

Datum der Disputation:

Zusammenfassung

Tumorerkrankungen, insbesondere solche im metastasierenden Stadium, erfordern effiziente Therapien. Krebstherapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie wirken über die Induktion von Apoptose. Resistenz gegen diese Behandlungsansätze geht einher mit der Blockierung relevanter apoptotischer Signalwege. Dennoch haben Tumorzellen nicht grundsätzlich die Fähigkeit verloren, apoptotischen Zelltod zu sterben, d. h. mit einem geeigneten Stimulus kann in jeder Tumorzelle Apoptose induziert werden.

In dieser Arbeit wurden Proteine entwickelt, die Enzyme apoptotischer Signalkaskaden selektiv in Tumorzellen einschleusen. Um Spezifität für transformierte Zellen zu erlangen, wurden diese Proteine mit Zellbindungsdomänen gekoppelt, die an tumorassoziierte Antigene binden. Als Zielstrukturen auf der Oberfläche von Krebszellen dienten die Rezeptoren der ErbB Familie „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) und ErbB2. Überexpression dieser Rezeptoren wird auf einer Vielzahl von Tumoren epithelialen Ursprungs beobachtet und ist ursächlich beteiligt an der malignen Transformation. Als Apoptoseinduktoren wurden die Serinprotease Granzym B (GrB) sowie das Protein „apoptosis inducing factor“ (AIF) eingesetzt. GrB induziert Apoptose durch direkte Aktivierung von Caspasen und Spaltung zentraler Caspasen-Substrate. Damit greift die Protease am unteren Effektorende apoptotischer Signalwege ein und umgeht so die meisten Resistenzmechanismen transformierter Zellen. Um GrB in Tumorzellen einzuschleusen, wurde die Protease mit dem ErbB2 spezifischen Antikörperfragment scFv(FRP5) gekoppelt. Zunächst wurde eine biotinylierte Variante der Protease (bGrB) über die hochaffine Streptavidin/Biotin Interaktion mit einem Fusionsprotein komplexiert, das aus dem scFv(FRP5) und Streptavidin besteht (SA-5). Komplexe aus enzymatisch aktivem bGrB und SA-5 wiesen selektive cytotoxische Aktivität gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen auf, die allerdings von der Präsenz des endosomolytischen Reagenz Chloroquin abhing. Dies zeigt die Notwendigkeit einer Translokation vom endosomalen Kompartiment, um internalisiertem GrB Zugang zu seinen cytosolischen Substraten zu ermöglichen.

Aufbauend auf diesen Ergebnissen, die grundsätzlich nachweisen, daß das Einbringen von GrB in Tumorzellen ausreichend ist, um in diesen Zellen Apoptose zu induzieren, wurden Fusionsproteine abgeleitet, in denen GrB direkt mit Zellbindungsdomänen fusioniert ist. Neben dem scFv(FRP5) wurde auch der EGFR-Ligand TGF α eingesetzt. Fusionsproteine bestehend aus reifem GrB und scFv(FRP5) (GrB-5) bzw. TGF α (GrB-T) wurden in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert und mit hohen Ausbeuten gereinigt. GrB-5 und GrB-T zeigten enzymatische Aktivität und wiesen Affinität zu ErbB2 bzw. EGFR auf. In Gegenwart von Chloroquin zeigten GrB-5 und GrB-T selektive cytotoxische Aktivität gegenüber Zellen, die den jeweiligen Zielrezeptor exprimieren. Die IC₅₀ Werte der Proteine lagen im pico- bis nanomolaren Bereich und sind damit vergleichbar mit denen rekombinanter Immun- bzw. Wachstumsfaktortoxine, die Exotoxin A (ETA) aus *Pseudomonas aeruginosa* als Effektor nutzen. Induktion von Apoptose erfolgte durch GrB-5 und GrB-T allerdings deutlich schneller (3 h) als durch ETA Fusionsproteine (72 h), da GrB im Gegensatz zu ETA direkt in apoptotische Signalkaskaden eingreift.

Um die weitere Charakterisierung von GrB-5 und GrB-T zu erleichtern, wurden in der vorliegenden Arbeit Möglichkeiten für eine Optimierung der Expression dieser Fusionsproteine in Hefe untersucht. Dazu wurde eine Strategie entwickelt, die auf der Beobachtung beruht, daß die Löslichkeit und Stabilität von Proteinen durch Fusion mit solchen Domänen erhöht werden kann, die selbst eine hohe

Löslichkeit und Stabilität besitzen. Ein Protein mit diesen Eigenschaften ist das Maltose Bindungsprotein (MBP) aus *E. coli*. In dieser Arbeit wurde MBP bei der Expression rekombinanter Proteine in *P. pastoris* eingesetzt, um die Ausbeute löslicher Proteine zu steigern. Es wurde eine Strategie entwickelt, die es erlaubt, MBP posttranslational *in vivo* vom Fusionspartner zu trennen. Hierzu wurde eine Erkennungssequenz der Protease Furin (furS) zwischen MBP und Fusionspartner eingefügt. Zunächst wurde untersucht, ob GrB als MBP Fusionsprotein in enzymatisch aktiver Form exprimiert werden kann, was eine Grundvoraussetzung für die Expression tumorspezifischer GrB Fusionsproteine in diesem System darstellt.

Die Ausbeute von GrB konnte durch diese Strategie erheblich gesteigert werden. Daneben war eine vollständige Prozessierung der Fusionsproteine innerhalb der Furin-Erkennungssequenz nachweisbar. Als MBP Fusionsprotein exprimiertes GrB wies allerdings keine enzymatische Aktivität auf. Weitere Untersuchungen zeigten, daß das terminale Serin der furS-Sequenz, das nach Spaltung durch Furin am N-Terminus von GrB zurückbleibt, die enzymatische Aktivität der Serinprotease inhibiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher nicht weiter versucht, die Ausbeute an tumorspezifischen GrB Fusionsproteinen durch Fusion mit löslichen Proteindomänen zu erhöhen. Für Proteine, die ein N-terminales Serin tolerieren, stellt das hier entwickelte System allerdings eine neuartige Strategie dar, um die Ausbeute in *P. pastoris* um ein Vielfaches zu steigern. Dies wurde anhand von rekombinantem ErbB2 als Modellprotein bestätigt.

Als alternativer Effektor in tumorspezifischen Fusionsproteinen wurde AIF als caspasenunabhängig agierendes proapoptotisches Signalmolekül eingesetzt. In apoptotischen Zellen bewirkt die Freisetzung von AIF aus dem mitochondrialen Intermembranraum die nachfolgende Translokation des Proteins in den Zellkern, woraufhin DNA-Fragmentierung induziert wird. Zum Einschleusen von AIF in Tumorzellen wurde das Flavoprotein mit dem scFv(FRP5) fusioniert (5-AIF). Um eine cytosolische Translokation von AIF zu erreichen, wurde ein Konstrukt abgeleitet, das zusätzlich die Translokationsdomäne von Exotoxin A enthält (5-E-AIF). Diese Domäne ist beim Wildtyp-Toxin notwendig für dessen retrograden Transport vom Endosom über den Golgi Apparat und das ER in das Cytosol. Innerhalb der Translokationsdomäne findet zudem eine Prozessierung durch die endosomale Protease Furin statt. AIF Fusionsproteine wurden in *E. coli* exprimiert, gereinigt und renaturiert. Die Proteine wiesen Affinität für ErbB2 auf und interagierten mit DNA, eine Eigenschaft, die essentiell für die proapoptotische Aktivität von AIF ist. 5-E-AIF zeigte gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen cytotoxische Aktivität, die vergleichbar mit der des Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA war. Diese Aktivität war allerdings nur in Gegenwart von Chloroquin gegeben. Das Protein 5-AIF, in dem die Translokationsdomäne fehlt, zeigte auch in Kombination mit Chloroquin keine Cytotoxizität. Eine mögliche Folgerung hieraus ist, daß die N-terminale Antikörperdomäne der Fusionsproteine die proapoptotische Aktivität der AIF Domäne blockiert. 5-E-A wird sehr wahrscheinlich durch die endosomale Protease Furin „aktiviert“, die den scFv(FRP5) durch proteolytische Spaltung innerhalb der ETA-Domäne entfernt haben könnte. Für die eigentliche Translokation reicht der ETA-Anteil allerdings nicht aus, wahrscheinlich, weil in dem hier abgeleiteten Konstrukt ein für die Funktionsweise des Wildtyp-Toxins essentielles ER Retentionssignal fehlte.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß durch Einsatz apoptotischer Signalmoleküle in tumorzell-spezifischen Fusionsproteinen hohe und selektive cytotoxische Aktivitäten erzielt werden können. Eine weitere Entwicklung dieser Proteine als mögliche Tumortheraeutika erscheint daher sinnvoll.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung

1	Einleitung	1
1.1	Apoptose	1
1.2	Molekulare Mechanismen apoptotischer Signalwege	2
1.2.1	Caspasen, Effektoren des programmierten Zelltods	2
1.2.2	Caspasen-Substrate	3
1.3	Induktion von Apoptose	4
1.3.1	Extrinsische Induktion der Apoptose	5
1.3.2	Intrinsische Induktion der Apoptose	8
1.3.3	Die caspasenunabhängigen Effektoren der Mitochondrien: AIF und Endonuklease G	10
1.4	Induktion von Apoptose durch cytotoxische Lymphocyten	11
1.4.1	Die Familie der Granzyme	11
1.4.2	Granzym B	12
1.4.3	Mechanismen der Granzym B induzierten Apoptose	14
1.5	Voraussetzungen für das Entstehen von Tumoren	16
1.5.1	Gerichtete Therapiekonzepte	19
1.5.2	Rezeptoren der ErbB Familie	20
1.5.3	ErbB Rezeptoren als Zielstrukturen für eine gerichtete Therapie	22
1.6	Ziel dieser Arbeit	26
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Chemikalien, Chromatographiemedien, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien	27
2.1.2	Antikörper und Nachweisreagenzien	28
2.1.3	Puffer	28
2.1.4	Plasmide	29
2.1.5	Oligonukleotide	32
2.1.6	Mikroorganismen und Kulturbedingungen	35
2.2	Methoden	36
2.2.1	Amplifizierung von Plasmid-DNA in <i>E. coli</i>	36
2.2.2	Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	37
2.2.3	Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA	37
2.2.4	Isolierung von RNA, Synthese und Amplifikation von cDNA	38
2.2.5	„Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) Anwendungen	38

2.2.6	Subklonierung von DNA-Fragmenten	40
2.2.7	Transformation von DNA-Konstrukten in <i>Pichia pastoris</i> (Elektroporation)	41
2.2.8	Gelelektrophoretische Methoden.....	42
2.2.9	Expression rekombinanter Proteine in <i>E. coli</i>	43
2.2.10	Expression rekombinanter Proteine in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	44
2.2.11	Periplasmapräparation aus <i>E. coli</i> Expressionskulturen	45
2.2.12	Reinigung rekombinanter Proteine durch IMAC unter nativen Bedingungen	46
2.2.13	Reinigung rekombinanter Proteine durch IMAC unter denaturierenden Bedingungen	46
2.2.14	Analytische Gelfiltration.....	47
2.2.15	Renaturierung gereinigter rekombinanter Proteine	47
2.2.16	Immunodetektion von Proteinen (Western blot)	48
2.2.17	Deglykosylierung der in <i>Pichia pastoris</i> exprimierten Proteine.....	49
2.2.18	Bindungsstudien	50
2.2.19	Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B	51
2.2.20	Biotinylierung gereinigter Proteine <i>in vitro</i>	52
2.2.21	Herstellung von Gesamtzellextrakt.....	52
2.2.22	Immunfluoreszenzfärbung	53
2.2.23	Cytotoxizitätstest (MTT)	54
2.2.24	Spaltung und enzymatische Aktivität endogener Caspasen.....	54
2.2.25	Hoechst-Färbung.....	55
2.2.26	Mikroinjektion.....	55
3	Ergebnisse	57
3.1	SA-5 als zellspezifisches Trägerprotein zum selektiven Einschleusen biotinylierter proapoptotischer Proteine in Tumorzellen	58
3.1.1	Konstruktion, Expression, Reinigung und Renaturierung von SA-5	59
3.1.2	Charakterisierung der Bindungs- und Internalisierungseigenschaften von SA-5	61
3.1.3	SA-5 vermittelte Aufnahme von bEGFP in ErbB2 exprimierende Zellen	64
3.1.4	Cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen	66
3.1.5	Cytotoxische Aktivität von SA-5/bGrB Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen	68
3.1.6	Zusammenfassung der Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.5	72
3.2	Chimäre GrB Fusionsproteine zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen.....	73
3.2.1	Konstruktion, Expression und Reinigung chimärer GrB Fusionsproteine	73
3.2.2	Enzymatische Aktivität chimärer GrB Fusionsproteine	77
3.2.3	Charakterisierung der Bindungseigenschaften von GrB Fusionsproteinen	81
3.2.4	Cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T.....	82
3.2.5	Cytotoxische Aktivität von cytosolischem GrB-5 nach Mikroinjektion.....	83

3.2.6	Intrazelluläre Lokalisation von GrB-5 und GrB-T	84
3.2.7	Cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T nach cytosolischer Translokation	85
3.2.8	Analyse der Spezifität der cytotoxischen Aktivität von GrB-5 und GrB-T	87
3.2.9	Induktion von Apoptose durch GrB Fusionsproteine	88
3.2.10	Aktivierung von endogener Caspase-3 durch GrB-T und GrB-5	90
3.2.11	Zusammenfassung der Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.10	92
3.3	Optimierte Expression rekombinanter Proteine in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	93
3.3.1	Modifizierte Expressionskonstrukte zur Expression von ErbB2 ₁₋₂₂₂ und GrB in <i>Pichia pastoris</i>	95
3.3.2	Analyse des verstärkenden Effekts der MBP-furS Proteindomäne auf die Expression von GrB und ErbB2 ₁₋₂₂₂ in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	97
3.3.3	Analyse der <i>Pichia pastoris</i> Expressionsklone	101
3.3.4	Enzymatische Aktivität von rekombinantem GrB exprimiert als MBP-furS Fusionsprotein	103
3.3.5	Zusammenfassung der Abschnitte 3.3.1 bis 3.3.4	104
3.4	AIF als Effektor in apoptoseinduzierenden Antikörperfusionsproteinen	106
3.4.1	Fusionsproteine zum selektiven Einschleusen von AIF in das Cytoplasma von Tumorzellen	108
3.4.2	Konstruktion, bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter AIF-Antikörperfusionsproteine	110
3.4.3	Funktionelle Charakterisierung von AIF-Antikörperfusionsproteinen	112
3.4.4	Cytotoxische Aktivität von AIF-Antikörperfusionsproteinen	116
3.4.5	Zusammenfassung der Abschnitte 3.4.1 bis 3.4.4	118
4	Diskussion	121
4.1	SA-5 als tumorspezifisches Trägerprotein zum selektiven Einschleusen apoptoseinduzierender Proteine in Tumorzellen	122
4.2	GrB als apoptoseinduzierender Effektor in tumorspezifischen Fusionsproteinen	126
4.3	Optimierte Expression rekombinanter Proteine in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	132
4.4	AIF als caspasenunabhängiger Effektor in humanisierten Immuntoxinen	137
5	Literatur	142
6	Abkürzungen und Einheiten	160
	Veröffentlichungen	162
	Danksagung	163
	Lebenslauf	164
	Eidesstattliche Erklärung	166

1 Einleitung

1.1 Apoptose

Die Neuentstehung und das Absterben von Zellen eines vielzelligen Organismus muß während der Entwicklung, aber auch im Zuge der allgemeinen Homöostase präzise kontrolliert werden. Um eine konstante Zellzahl zu gewährleisten, sterben von den ca. 30 Billionen Zellen eines erwachsenen Menschen täglich etwa 10 Milliarden Zellen. Damit wird die Zahl der durch Mitose neu gebildeten Zellen ausgeglichen. Hierfür ist ein effizienter aktiver physiologischer Prozeß notwendig, der stark reguliert sein muß, da der Zelltod das einzige irreversible Schicksal einer Zelle darstellt (Evan und Vousden, 2001). Generell kann als physiologischer Zelltod das Sterben von Zellen in einem Organismus betrachtet werden, das unter Beteiligung endogener Proteine aufgrund eines Prozesses erfolgt, der durch den Organismus selbst eingeleitet wird mit dem Ziel, eigene Zellen zu eliminieren.

Der Begriff „programmierter Zelltod“ wurde erstmalig 1964 von Lockshin und Williams verwendet, um die spezifische Eliminierung von Zellen während der Entwicklung der Seidenmotte zu beschreiben. Diese Eliminierung erfolgte immer in einer identischen Abfolge und war daher offensichtlich genetisch festgelegt (Lockshin und Williams, 1964). Ursprünglich wurde der Begriff „programmierter Zelltod“ deshalb verwendet, um das gezielte Absterben von Zellen während der Entwicklung zu beschreiben [Übersicht in: (Formigli *et al.*, 2004)].

Unabhängig hiervon beschrieben Kerr, Wyllie und Curie grundlegende morphologische Veränderungen von sterbenden Zellen, denen sie einen geordneten und konservierten Prozeß zugrundelegten. Diesen bezeichneten sie als „Apoptose“ (Kerr *et al.*, 1972). Beide Begriffe, „programmierter Zelltod“ und „Apoptose“, werden heute weitgehend synonym verwendet, unabhängig vom Stimulus der zum Tod der Zelle führt.

Im Gegensatz zur Nekrose, die durch äußere, physikalische Schädigung (z. B. Hyperthermie oder Verletzung) hervorgerufen wird und ohne genetische Kontrolle abläuft, ist Apoptose ein aktiver Prozeß, in deren Verlauf Stimuli aus der Zellumgebung oder Signale, die in der Zelle selbst entstehen, ein genetisch angelegtes Programm zum Ablauf bringen, das schließlich zum kontrollierten Absterben von Zellen führt. Apoptose und Nekrose lassen sich sowohl morphologisch als auch biochemisch unterscheiden. Während die Nekrose zur Zerstörung der Cytoplasmamembran und so zum Entleeren des Zellinhalts führt, bilden sich bei der Apoptose membranumhüllte Vesikel, die Zellkernfragmente und Cytoplasma enthalten (Hengartner, 2000). Diese sogenannten „apoptotic bodies“ werden von phagocytierenden Zellen erkannt und beseitigt. Eine Schädigung von Nachbarzellen wird auf diese Weise minimiert und entzündliche Reaktionen vermieden, was im deutlichen Gegensatz zur Nekrose steht. Allerdings können beide Formen des Zelltods auch gemeinsam auftreten. So führen etwa verletzungsbedingte Nekroseerscheinungen oft zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren (z. B. Cytokinen), welche dann im benachbarten Gewebe apoptotisch wirken können (Steller, 1995). Andererseits wird bei massiver Apoptose in Geweben häufig Sekundärnekrose beobachtet.

1.2 Molekulare Mechanismen apoptotischer Signalwege

Genetische und biochemische Untersuchungen haben sehr komplexe Mechanismen offengelegt, die für die Induktion, die Signalleitung und die molekularen Änderungen während der Apoptose verantwortlich sind. Diese Mechanismen sind in unterschiedlichen Organismen wie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans*, der Fliege *Drosophila melanogaster* und auch im Menschen weitgehend konserviert. Die Komponenten und Signalwege, die für die Apoptose im Menschen verantwortlich sind, werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

1.2.1 Caspasen, Effektoren des programmierten Zelltods

Caspasen sind Effektoren des programmierten Zelltods und für die meisten morphologischen Veränderungen während der Apoptose verantwortlich. So konnte z. B. in Caspase-3-negativen Zellen weder das charakteristische „membrane blebbing“ noch „DNA laddering“, die internukleosomale Degradation der chromosomalen DNA, beobachtet werden (Janicke *et al.*, 1998; Slee *et al.*, 2001).

Caspasen sind konstitutiv exprimierte cysteinabhängige aspartatspezifische Proteasen, die als Vorläufermoleküle mit geringer oder ohne katalytische Aktivität synthetisiert werden [Übersicht: (Nicholson, 1999; Shi, 2002; Stennicke und Salvesen, 2000; Thornberry, 1999; Thornberry und Lazebnik, 1998)]. Die apoptotischen Signalwege laufen in der Aktivierung von Caspasen zusammen, die dann das Zelltodprogramm auslösen. Neuere Daten beschreiben jedoch auch caspasenunabhängige Formen der Apoptose (Cregan *et al.*, 2004; Lockshin und Zakeri, 2004) (vgl. Abschnitt 1.3.3).

Alle 14 Caspasen der Säuger, von denen 11 auch im Menschen gefunden wurden, werden als Vorläuferproteine in den kernhaltigen Zellen synthetisiert. In der Zelle sind sie im Cytoplasma sowie z. T. auch in den Mitochondrien und dem ER lokalisiert (Shikama *et al.*, 2001; Zhivotovsky *et al.*, 1999). Caspasen weisen Homologien in Aminosäuresequenz, Struktur und Substratspezifität auf (Nicholson, 1999). Sie bestehen aus drei Domänen: einer N-terminalen Prodomäne, einer großen Untereinheit (ca. 20 kDa) und einer kleinen Untereinheit (ca. 10 kDa). Die N-terminale Prodomäne hat eine hochvariable Struktur und Länge (23 bis 216 Aminosäuren).

Die Aktivierung der Caspasen erfordert zwei proteolytische Spaltungen, die zwischen großer und kleiner Untereinheit sowie zwischen Prodomäne und großer Untereinheit stattfinden. Die große und die kleine Untereinheit lagern sich daraufhin zu einem Heterodimer zusammen. Zwei Heterodimere bilden schließlich ein enzymatisch aktives Tetramer mit zwei aktiven, voneinander unabhängigen katalytischen Zentren (Grutter, 2000; Shi, 2002). Die proteolytische Spaltung von Substraten erfordert eine Signalsequenz aus vier Aminosäuren, die mit einem Aspartat enden muß. Je nach Aminosäureabfolge werden verschiedene Signalsequenzen durch unterschiedliche Caspasen gespalten (Thornberry *et al.*, 1997). Neben der Primärstruktur spielt offensichtlich auch die Sekundär- und die Tertiärstruktur der Substrate eine Rolle, da nicht alle Proteine mit entsprechender Signalsequenz durch Caspasen prozessiert werden können (Thornberry und Lazebnik, 1998). Caspasen werden aufgrund ihrer Funktion in der

Signaltransduktion, die letztendlich zum programmierten Zelltod führt, in zwei Gruppen eingeteilt: Die Initiatorcaspasen (Caspasen 2, 8, 9 und 10) mit langen Prodomänen und die Effektorcaspasen (Caspasen 3, 6 und 7) mit kurzen Prodomänen. Die Caspasen 1, 4, 5 und 11 scheinen hauptsächlich an der Prozessierung von Cytokinen beteiligt zu sein und haben keinen direkten Einfluß auf den programmierten Zelltod (Meergans *et al.*, 2000). Die proteolytische Spaltung von Caspasen zwischen den Untereinheiten erfolgt wie die Spaltung von anderen Caspasen-Substraten nach Aspartatresten, so daß sich Caspasen gegenseitig aktivieren können. Daher kann die Aktivierung von Caspasen durch gegenseitige Spaltung zu einer Verstärkung apoptotischer Signale führen. Eine solche Caspasen-Kaskade erklärt auch das sehr schnelle Ablaufen des apoptotischen Zelltods (Strasser, 1999).

Die Aktivierung einer Effektorcaspase erfordert die Spaltung durch eine Initiatorcaspase oder durch Granzym B (siehe Abschnitt 1.4). Durch diese Spaltung wird die enzymatische Aktivität der Effektorcaspase stark erhöht, so daß sie ihrerseits zahlreiche Substrate spalten kann, was schließlich zum apoptotischen Phänotyp führt. Im Gegensatz hierzu erfolgt die Aktivierung der Initiatorcaspasen auf andere Weise. So hat im Fall isolierter Caspase-9 z. B. die Spaltung des Vorläufermoleküls nur eine geringe Steigerung der katalytischen Aktivität zur Folge (Srinivasula *et al.*, 2001; Stennicke *et al.*, 1999). Im Kontext des „apoptosome“ hingegen erfolgt eine starke Zunahme der enzymatischen Aktivität von prozessierter, aber auch von ungespaltener Caspase-9 (Rodriguez und Lazebnik, 1999; Srinivasula *et al.*, 2001). Für die Aktivierung von Caspase-9 scheint also weniger die Spaltung zwischen den Untereinheiten, als vielmehr der Kontakt zu Proteinen des „apoptosome“ entscheidend zu sein. Gleiches gilt vermutlich für die Aktivierung von Caspase-8 im „death inducing signaling complex“ (DISC). Hier wird wahrscheinlich eine Konformationsänderung der Procaspase-8 induziert, die durch Dimerisierung hervorgerufen wird. Diese aktive Konformation der Procaspase-8 wird durch autokatalytische Prozessierung lediglich stabilisiert (Boatright *et al.*, 2003; Donepudi *et al.*, 2003). Die Spaltung selbst ist aber nicht zwingend erforderlich für die katalytische Aktivität (vgl. Abschnitt 1.3.1). Das „induced proximity“ Modell (Salvesen und Dixit, 1999), mit dem bisher die Aktivierung von Caspasen beschrieben wurde, muß aus heutiger Sicht für die Aktivierung der Initiatorcaspasen modifiziert werden. Ursprünglich wurde davon ausgegangen, daß allein die räumliche Nähe mehrerer Caspasen zur gegenseitigen Spaltung und so zur Aktivierung führt. Wahrscheinlich nehmen die Initiatorcaspasen jedoch durch Dimerisierung und durch Interaktion mit anderen Proteinen eine aktive Konformation ein, die durch intermolekulare Spaltung lediglich stabilisiert wird. Auf die enzymatische Aktivität der Initiatorcaspasen hat diese Spaltung nur geringen Einfluß.

Durch aktivierte Initiatorcaspasen werden dann Effektorcaspasen aktiviert, die durch Spaltung zellulärer Substrate den Zelltod auslösen, was zum charakteristischen Phänotyp apoptotischer Zellen führt.

1.2.2 Caspasen-Substrate

Aktive Effektorcaspasen spalten zahlreiche Substrate, was innerhalb kurzer Zeit zum Abbau zellulärer

Strukturen führt. Bisher wurden über 280 Caspasen-Substrate (sog. „death substrates“) in der Zelle identifiziert (Fischer *et al.*, 2003; Martin, 2003). Dazu gehören Strukturproteine (α -Aktin, β -Aktin), Proteinkinasen (MEKK-1, PKC δ , Wee-1, Akt-1, FAK), Transkriptions- und Translationsfaktoren (Max, CREB, STAT-1, NF κ B, I κ B α , SREBPs, hnRNPs, U1-70 kDa, snRNP, SP1), Proteine, die an der DNA-Reparatur oder Zellzykluskontrolle beteiligt sind (PARP, DNA-PKcs, pRb, NuMA, Mdm-2, cdc27), Apoptose-Regulatoren (Bcl-2, Bcl-x_L, Bid, XIAP) und Membranrezeptoren (EGFR, ErbB2, TNF-R1, Glutamat Rezeptor). Eine vollständige Liste bisher identifizierter Substrate mit entsprechenden Referenzen ist in (Fischer *et al.*, 2003) aufgeführt. Caspasen-Substrate werden jedoch nicht immer durch Spaltung inaktiviert, sondern können ebenso durch Prozessierung aktiviert werden. Zahlreiche Caspasen-Substrate agieren auch als Vermittler oder als Verstärker apoptotischer Signale. Nicht bei allen diesen Substraten ist die Relevanz der Spaltung für den Ablauf des apoptotischen Zelltods geklärt. Bei einigen bekannten Substraten kann jedoch ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen ihrer Spaltung und den morphologischen Veränderungen von apoptotischen Zellen hergeleitet werden. Ein Beispiel hierfür ist die internukleosomale Spaltung der chromosomalen DNA („DNA laddering“) während der Apoptose. Diese Fragmentierung wird vermittelt durch die Aktivierung des „DNA fragmentation factor“ (DFF), einem heterodimeren Proteinkomplex, der aus der Endonuklease DFF40/CAD (caspase activated DNase) und deren Inhibitor DFF45/ICAD (inhibitor of CAD) besteht (Enari *et al.*, 1998; Sakahira *et al.*, 1998). ICAD dient bei der Synthese von CAD als Chaperon und liegt in nicht-apoptotischen Zellen an CAD gebunden vor, wodurch die Nukleaseaktivität von CAD vollständig inhibiert wird (Sakahira *et al.*, 2000). ICAD ist ein Substrat von Caspase-3. Spaltung des Inhibitors führt zur Translokation von CAD in den Zellkern und hier schließlich zur Fragmentierung der chromosomalen DNA. Apoptotische Zellen, die kein CAD exprimieren, zeigen keine charakteristische DNA-Fragmentierung, jedoch andere typische Merkmale des programmierten Zelltods (Enari *et al.*, 1998; Nagata, 2000; Sakahira *et al.*, 1998).

1.3 Induktion von Apoptose

Eine Vielzahl verschiedener Signale kann zur Induktion von Apoptose in Zellen führen [Übersicht: (Strasser *et al.*, 2000; Zörnig *et al.*, 2001)]. Entwicklungsbedingte Apoptose wird meist auf Ebene der Transkription initiiert. Allgemein ist das Überleben einer Zelle abhängig von Überlebensfaktoren, d. h. eine Zelle stirbt, wenn sie nicht aus ihrer Umgebung Signale erhält, die das Anschalten des apoptotischen Zelltodprogramms verhindern (Ishizaki *et al.*, 1995). Darüber hinaus wird Apoptose initiiert infolge von zellulärem Streß wie Sauerstoff- oder Nährstoffmangel, fehlendem Zell-Matrix-Kontakt, DNA-Schäden oder dem Einwirken cytotoxischer Substanzen, die die normalen Lebensfunktionen der Zelle blockieren. Im Fall von DNA-Schäden erfolgt die Induktion von Apoptose über P53. Die molekularen Mechanismen, die durch andere Streß-Signale induziert werden und zur Aktivierung von Caspasen führen, sind hingegen noch weitgehend unverstanden.

Daneben kann eine Zelle direkte Todessignale aus der Umgebung erhalten, die über Membranrezeptoren unmittelbar die Aktivierung von Caspasen bewirken und apoptotischen Zelltod initiieren. An

dieser ligandeninduzierten Induktion der Apoptose sind Mitglieder der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Rezeptor-Superfamilie und deren Liganden beteiligt, zu denen FAS, TRAIL und TNF gehören [siehe Abschnitt 1.3.1; (Sartorius *et al.*, 2001)]. Diese Liganden werden z. B. von cytotoxischen Lymphocyten exprimiert. Daneben verfügen diese Immuneffektorzellen über einen weiteren Mechanismus, um Apoptose in virusinfizierten, körperfremden oder transformierten Zellen auszulösen: In sog. cytotoxischen Vesikeln sind verschiedene Serinproteasen (Granzyme) sowie das porenbildende Protein Perforin enthalten, die nach Kontakt mit einer Zielzelle sekretiert werden, in diese eindringen und dort Apoptose auslösen [vgl. Abschnitt 1.4.1; (Barry und Bleackley, 2002)].

Für die Aktivierung der Initiatorcaspasen sind damit drei unterschiedliche Mechanismen bekannt, die je nach Ursprung des apoptotischen Signals in extrinsische oder intrinsische Wege unterteilt werden. Zu den extrinsischen Wegen zählen die Aktivierung von Todesrezeptoren sowie die Sekretion von Granzym B. Der intrinsische Weg wird infolge von zellulärem Streß aktiviert, wobei v. a. die Freisetzung von Cytochrom *c*, aber auch anderer Proteine (Smac/DIABLO, AIF etc.) aus den Mitochondrien eine besondere Rolle spielt (vgl. Abschnitt 1.3.2).

1.3.1 Extrinsische Induktion der Apoptose

Ein gut untersuchter Signalweg, der zur Induktion von Apoptose führt, wird durch die ligandeninduzierte Aktivierung von Mitgliedern der TNF Rezeptor-Superfamilie ausgelöst (Debatin und Krammer, 2004; Locksley *et al.*, 2001; Thorburn, 2004; Zörnig *et al.*, 2001).

Die Aktivierung dieser Rezeptoren führt je nach Zelltyp und Kontext zu einer Vielzahl zellulärer Antworten. Neben der Induktion von Apoptose gehören dazu auch die Aktivierung von T-Zellen, Induktion von Proliferation, Differenzierung oder Überlebens-Signalwegen. Einige der Rezeptoren dieser Superfamilie, die Apoptose induzieren können, besitzen eine charakteristische intrazelluläre „death domain“. Dies sind TNF-R1, CD95/Fas/Apo-1, DR 3 (death receptor), DR4/Trail-R1, DR5/Trail-R2 und DR6. Die Liganden dieser Rezeptoren, z. B. TNF und CD95-Ligand (FasL/CD95L), werden als Typ II membranassoziierte Proteine synthetisiert, die als Tri- oder Oligomere zur Rezeptoroligomerisierung führen. Einige dieser Liganden, wie CD95L und TNF, sind nach proteolytischer Spaltung auch in löslicher Form funktional (Hughes und Crispe, 1995), vermutlich jedoch nicht so wirksam wie membrangebundene Liganden (Thorburn, 2004). Gut untersucht ist die physiologische Bedeutung von CD95 für das Immunsystem. CD95 und CD95L sind beteiligt an der Eliminierung aktivierter peripherer T-Zellen am Ende einer Immunreaktion, der Immunabwehr virusinfizierter oder transformierter Zellen, der Induktion von Apoptose in B-Zellen und der Eliminierung von inflammatorischen Zellen in immunprivilegierten Geweben (Krammer, 2000). CD95 und CD95L sind auch an der pathologischen Suppression von Zellen des Immunsystems beteiligt. Ein Beispiel hierfür ist die konstitutive Expression von CD95L auf Tumorzellen, die zur Eliminierung immunreaktiver Zellen, die gegen diese Tumorzellen gerichtet sind, führen kann (Hahne *et al.*, 1996).

Nach Ligandenbindung erfolgt die intrazelluläre Signalweiterleitung dieser Rezeptoren über die

Ausbildung eines „death inducing signaling complex“ (DISC) am intrazellulären Teil der Rezeptoren, in dem Procaspase-8 und wahrscheinlich auch Procaspase-10 aktiviert werden (Kischkel *et al.*, 1995; Locksley *et al.*, 2001; Salvesen und Dixit, 1999). CD95L kann als Homotrimer an drei Fas-Rezeptoren binden (Nagata, 1996), die dadurch trimerisiert werden. Da die cytoplasmatischen „death domains“ der Rezeptoren selbst zur Aggregation neigen, bildet sich durch Ligandenbindung ein Rezeptoroligomer (Huang *et al.*, 1996), an das sich das intrazelluläre Adaptorprotein FADD/MORT1 („Fas-associated death domain“) entweder direkt anlagern kann (Chinnaiyan *et al.*, 1995) oder indirekt über das Adaptorprotein TRADD („TNF receptor-associated protein with death domain“). FADD enthält zusätzlich eine „death effector domain“ (DED), an die andere Moleküle mit gleicher Domäne binden können. Procaspase-8 besitzt ebenfalls eine DED. Hierüber wird Procaspase-8 an den aktivierten Rezeptorkomplex rekrutiert (Boldin *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996). Im DISC wird eine Konformationsänderung der Procaspase-8 induziert, die durch Dimerisierung hervorgerufen wird. Diese aktive Konformation der Procaspase-8 wird durch autokatalytische (wahrscheinlich intramolekulare) Spaltung der Caspase-8 stabilisiert (vgl. Abschnitt 1.2.1) (Boatright *et al.*, 2003; Donepudi *et al.*, 2003). Nach Abspaltung der Prodomäne wird aktive Caspase-8 aus dem DISC freigesetzt und kann Effektorcaspasen aktivieren. Der endogene Inhibitor c-FLIP (ELICE-like inhibitory protein) kann ebenfalls an FADD binden und verhindert auf diese Weise die Rekrutierung von Procaspase-8 zum Rezeptorkomplex (Irmeler *et al.*, 1997; Krueger *et al.*, 2001). Von c-FLIP existieren zwei Isoformen, c-FLIP-long und c-FLIP-short. Beide Proteine besitzen zwei DED. c-FLIP-long enthält zudem eine Domäne ähnlich der katalytischen Domäne von Caspase-8, die jedoch enzymatisch inaktiv ist. Ursprünglich wurde angenommen, daß beide Isoformen sowie verschiedene virale Proteine, die homolog zu c-FLIP-short sind, die Aktivierung von Procaspase-8 verhindern. Dies würde auch die Resistenz verschiedener Tumorzellen, die c-FLIP überexprimieren, gegenüber CD95L und TRAIL induzierter Apoptose erklären, (Krueger *et al.*, 2001; Tschopp *et al.*, 1998). Die Rekrutierung von c-FLIP-long zum DISC kann allerdings auch die Aktivierung von Caspase-8 fördern (Chang *et al.*, 2002; Micheau *et al.*, 2002).

Ein Substrat von Caspase-8 ist das Protein Bid, ein Mitglied der Bcl-2 Familie (vgl. Abschnitt 1.3.2). Spaltung von Bid führt zur Bildung von tBid (truncated Bid). Die Translokation von Bid zu den Mitochondrien induziert, vermittelt durch die beiden proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bak und Bax, die Freisetzung von Cytochrom *c* und anderer mitochondrialer Proteine wie Smac/DIABLO, Omi/HtrA2, AIF, Endonuklease G, Caspase-2 oder Caspase-9 aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Du *et al.*, 2000; Fulda *et al.*, 2002; Kroemer und Reed, 2000; Li *et al.*, 2001; Roy und Nicholson, 2000; Suzuki *et al.*, 2001; van Loo *et al.*, 2002).

Die Freisetzung von Cytochrom *c* erlaubt die Bildung des „apoptosome“ und schließlich die Aktivierung von Caspase-9 (vgl. Abschnitt 1.3.2), die wiederum Effektorcaspasen aktiviert. Zusätzlich kann die mitochondrienabhängige Aktivierung von Caspase-6 zu einer vermehrten Spaltung von Procaspase-8 und so zu einer Verstärkung der CD95 vermittelten Apoptose führen. Überexpression von Bcl-2 hemmt diesen durch CD95 vermittelten mitochondrialen Apoptoseweg, verhindert jedoch nicht die

direkte Aktivierung von Caspase-3 durch Caspase-8 (Scaffidi *et al.*, 1998).

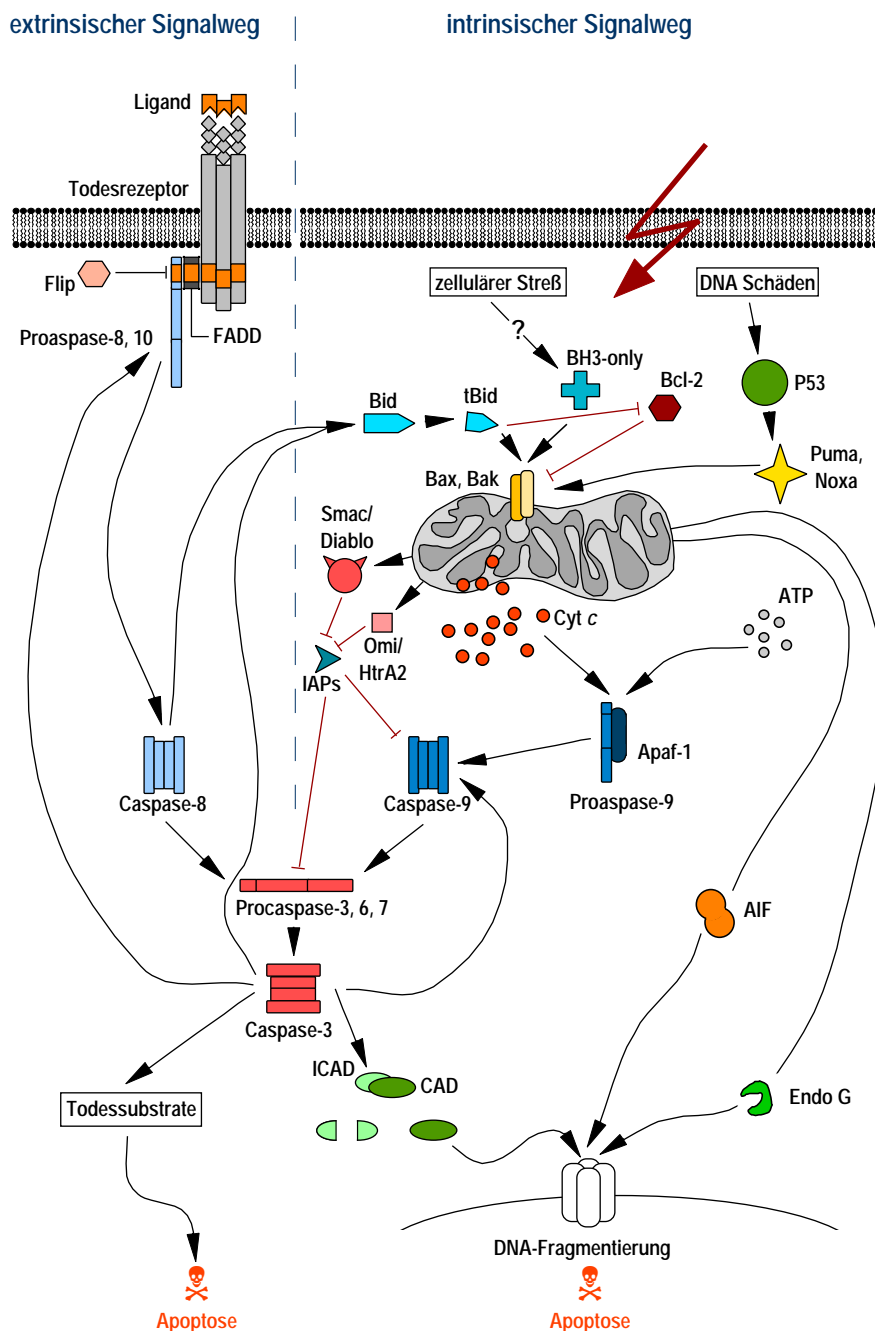


Abb. 1.1 | **Schematische Darstellung des intrinsischen und extrinsischen Apoptose-Signalwegs.** Der extrinsische Signalweg wird durch ligandeninduzierte Oligomerisierung von Rezeptoren der TNF-Familie aktiviert und führt zur Aktivierung von Caspase-8. Der intrinsische Signalweg hingegen wird durch zellulären Streß induziert, der zur Freisetzung von Cytochrom c aus dem mitochondrialen Intermembranraum führt. Cytoplasmatisches Cytochrom c ist essentiell für die Bildung des „apoptosome“, in dem die Aktivierung von Caspase-9 erfolgt. Aktive Caspase-8 und aktive Caspase-9 spalten und aktivieren Effektorcaspasen. Weitere Erläuterungen im Text.

Ähnlich zu CD95L induziert TRAIL Apoptose in vielen Tumorzellen. So führt die Bindung von TRAIL an die TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 zu Rezeptoroligomerisierung und Bildung des DISC gefolgt von Aktivierung der Caspase-8 und wahrscheinlich auch Caspase-10. Drei weitere TRAIL-Rezeptoren TRAIL-R3, -R4 und -R5 enthalten keine funktionelle „death domain“ und können so keine proapoptotischen Signale leiten. Sie wirken stattdessen als „decoy“ Rezeptoren (Degli-Esposti *et al.*, 1997a; Degli-Esposti *et al.*, 1997b; LeBlanc und Ashkenazi, 2003; Pan *et al.*, 1997). TRAIL tötet anscheinend hauptsächlich Tumorzellen ab, nicht-transformierte Zellen hingegen sind weitgehend resistent gegenüber TRAIL induzierter Apoptose (LeBlanc und Ashkenazi, 2003; Wajant *et al.*, 2002; Walczak und Krammer, 2000). Die hierbei zugrundeliegenden Mechanismen sind nicht bekannt. Die Sensitivität gegenüber TRAIL induzierter Apoptose hängt jedoch wahrscheinlich nicht nur von unterschiedlichen Expressionsniveaus agonistischer und antagonistischer TRAIL-Rezeptoren auf der Zelloberfläche ab, sondern wird intrazellulär reguliert (Debatin und Krammer, 2004).

1.3.2 Intrinsische Induktion der Apoptose

Im Gegensatz zum extrinsischen apoptotischen Signalweg, der durch Bindung von Liganden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche und der nachfolgenden Bildung eines Rezeptorkomplexes aktiviert wird, ist der intrinsische Signalweg [Übersicht: (Fumarola und Guidotti, 2004)] ein Resultat von Zellstreß. Zellstreß beschreibt eine Vielzahl von Stimuli, die die Zelle schädigen. Dazu gehören UV- und γ -Strahlung, genotoxische und cytotoxisch wirkende Chemikalien, freie Radikale, Stoffwechselgifte, der Entzug von Wachstumsfaktoren und Cytokinen, Toxine, die das Cytoskelett schädigen, Ablösen von Zellen von der extrazellulären Matrix etc. All diese Stimuli können zu einer Störung der mitochondrialen Membranintegrität führen (Kroemer und Reed, 2000), die die Freisetzung verschiedener proapoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum auslöst. Die molekularen Mechanismen, über die diese Stimuli zu Änderungen in der äußeren Mitochondrienmembran führen, sind weitgehend unbekannt. Ein zentrales Molekül bei der Induktion von Apoptose als Antwort auf DNA-Schäden ist der P53 Tumorsuppressor. P53 wird durch zellulären Streß aktiviert. Dies hat die Transaktivierung oder die Repression spezifischer Zielgene zur Folge und kann zur Induktion von Apoptose führen. Zusätzlich trägt P53 auch transkriptionsunabhängig zur Induktion von Apoptose bei. Aktivierung von P53 führt jedoch nicht zwangsläufig zum Tod der Zelle. Abhängig vom Stimulus kann P53-Aktivierung z. B. zu einer verstärkten DNA Reparatur und so zum Überleben der Zelle beitragen. Weitere Effekte können auch Zellzyklusarrest sowie Differenzierung sein. Stimuli, die zur Aktivierung von P53 führen, die Rolle von P53 in der stressinduzierten Apoptose und andere Effekte der P53 Aktivierung sind in folgenden Übersichtsartikeln detailliert beschrieben: (Alarcon-Vargas und Ronai, 2002; Ashcroft *et al.*, 2000; Bargonetti und Manfredi, 2002; Hickman *et al.*, 2002; Michael und Oren, 2002; Oren, 2003; Sears und Nevins, 2002; Shen und White, 2001; Vogelstein *et al.*, 2000). Die herausragende Stellung, die P53 für die streßinduzierte Apoptose in Zellen einnimmt, wird dadurch unterstrichen, daß ein hoher Prozentsatz humaner Tumore kein funktionales P53 mehr besitzen, in Tumorzellen also offensichtlich eine Selektion

gegen das *p53* Tumorsuppressorgen abläuft.

Eine kritische Rolle für die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran spielen Mitglieder der Bcl-2 Familie (Gross *et al.*, 1999; Kirkin *et al.*, 2004), die bezüglich ihrer Struktur und Funktion in drei Klassen eingeteilt werden können. Bcl-2 und Bcl-x_L (Klasse 1) sowie andere Proteine dieser Klasse wirken antiapoptotisch und schwächen streßinduzierte apoptotische Signalwege ab. Andere Bcl-2 Proteine wie Bax und Bak sind proapoptotisch und können den antiapoptotischen Effekten von Bcl-2 und Bcl-x_L durch Dimerisierung mit diesen Proteinen entgegenwirken. Bax vermittelt die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran (Lassus *et al.*, 2002; Nechushtan *et al.*, 1999). Zur dritten Klasse gehören die „BH3-only“ Proteine, zu denen u. a. die proapoptotischen Proteine Bid, Bad, Noxa, PUMA, Bik, Bim und Bmf zählen (Huang und Strasser, 2000; Puthalakath und Strasser, 2002). Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran führt schließlich zur Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Wang, 2001). Zu diesen Proteinen zählen Cytochrom *c*, Smac/DIABLO, HtrA2/Omi, das Flavoprotein AIF (vgl. Abschnitt 1.3.3) und Endonuklease G. Im Cytosol interagiert Cytochrom *c* mit dem Adaptorprotein Apaf-1 und induziert eine Konformationsänderung, die die stabile Bindung von dATP/ATP erlaubt, was zur Bildung eines heptameren Apaf-1/Cytochrom *c* Komplexes, dem „apoptosome“ führt (Acehan *et al.*, 2002; Jiang und Wang, 2000). In diesem Komplex wird Caspase-9 aktiviert, die die Effektorcaspasen-3, -6 und -7 spaltet (Li *et al.*, 1997; Rodriguez und Lazebnik, 1999). Proteine, die der Aktivierung der Caspasen entgegenwirken, sind die IAPs „inhibitors of apoptosis proteins“. Sie binden an die aktiven Formen der Caspasen-3, -7 und -9 und neutralisieren diese (Salvesen und Duckett, 2002). Die ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzten Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi heben diesen inhibitorischen Effekt der IAPs auf (Du *et al.*, 2000; Hegde *et al.*, 2002; Suzuki *et al.*, 2001; Verhagen *et al.*, 2000).

Andere Proteine, die aus den Mitochondrien freigesetzt werden, sind der „apoptosis inducing factor“ (AIF) und Endonuklease G. Beide Proteine werden in den Zellkern importiert und induzieren dort eine caspasenunabhängige Fragmentierung der chromosomalen DNA und periphere Chromatinkondensation (Cande *et al.*, 2002; Lorenzo *et al.*, 1999). Auf die proapoptotischen Eigenschaften von AIF wird im nächsten Abschnitt dieser Arbeit näher eingegangen.

Einige neuere Arbeiten beschreiben, daß die streßinduzierte Apoptose die Aktivierung von Caspasen erfordert, um die Membranpermeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und schließlich die Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum zu gewährleisten (Enoksson *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2002; Robertson *et al.*, 2002). Hierbei scheint vor allen Dingen Caspase-2 eine Rolle zu spielen. Der molekulare Mechanismus, der zur Aktivierung von Caspase-2 führt, ist nicht bekannt. Vermutlich sind aber das „death domain“ enthaltende Protein PIDD und das Adaptorprotein RAIDD an der Aktivierung von Caspase-2 beteiligt (Read *et al.*, 2002; Tinel und Tschopp, 2004). Prozessierte Caspase-2 kann zur Freisetzung von Cytochrom *c* aus dem mitochondrialen Intermembranraum führen. Katalytische Aktivität der Caspase-2 ist hierfür nicht erforderlich, wohl aber die intramolekulare Spaltung (Robertson *et al.*, 2004).

1.3.3 Die caspasenunabhängigen Effektoren der Mitochondrien: AIF und Endonuklease G

Weitere proapoptotische Proteine, die in Folge apoptotischer Stimuli aus den Mitochondrien freigesetzt werden, sind Endonuklease G und „apoptosis inducing factor“ (AIF). AIF ist ein Flavoprotein mit NADH Oxidaseaktivität, das als 67 kDa Protein mit N-terminalem mitochondrialen Lokalisationssignal synthetisiert wird, welches nach dem Import in den Intermembranraum der Mitochondrien abgespalten wird (Susin *et al.*, 1999). Durch diese Prozessierung entsteht reifes AIF, das ein Molekulargewicht von 57 kDa besitzt. AIF wurde erstmals bei der Untersuchung apoptotischer Prozesse in zellfreien Systemen identifiziert. Hierbei wurde gezeigt, daß Überstände von Mitochondrien, in denen die Membranpermeabilisierung induziert war, Chromatinkondensation in isolierten Zellkernen hervorrufen (Susin *et al.*, 1996). Das Protein, welches für diese Aktivität verantwortlich ist, wurde schließlich als ein mitochondriales Protein identifiziert, das in Folge apoptotischer Signale aus den Mitochondrien freigesetzt, in den Zellkern importiert wird und dort Chromatinkondensation induziert (Susin *et al.*, 1999). In Folge wurde gezeigt, daß AIF in zahlreichen zellulären Systemen Apoptose auch ohne Aktivität von Caspasen induziert [Übersicht in: (Cande *et al.*, 2004)]. Untersuchungen mit verschiedenen Zellsystemen zeigten, daß das Einbringen von reifem AIF in das Cytosol durch Transfektion, Infektion mit adenoviralen Vektoren oder durch Mikroinjektion zur Induktion von Apoptose führt (Cregan *et al.*, 2002; Joza *et al.*, 2001; Loeffler *et al.*, 2001; Susin *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002). Die durch AIF vermittelte Fragmentierung der chromosomalen DNA unterscheidet sich jedoch von der internukleosomalen DNA-Fragmentierung, die durch CAD katalysiert wird („DNA laddering“, vgl. Abschnitt 1.2.2), da AIF deutlich größere DNA-Fragmente von etwa 50 kb generiert (Susin *et al.*, 1999).

Der Mechanismus, über den AIF DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation induziert, ist nicht im Detail bekannt. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß für die proapoptotische Funktion von AIF die Fähigkeit des Proteins erforderlich ist, sequenzunspezifisch an DNA zu binden. Dies wurde mit AIF Punktmutanten bewiesen, die keine DNA-bindende Aktivität mehr besaßen (Ye *et al.*, 2002). Weitere Hinweise auf den Mechanismus der nukleären Aktivität von AIF könnten Untersuchungen mit dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* liefern. Für das *C. elegans* AIF Homolog WAH1 konnte gezeigt werden, daß es mit dem *C. elegans* Endonuklease G Homolog CPS6 interagiert. *In vitro* Untersuchungen zeigten, daß CPS6 allein nur geringe Nukleaseaktivität besitzt, diese aber durch Zugabe von WAH1 erheblich verstärkt wird (Wang *et al.*, 2002). In Säugerzellen wird Endonuklease G in Folge apoptotischer Stimuli ebenfalls aus den Mitochondrien freigesetzt, gelangt in den Zellkern und führt hier zur chromosomalen DNA-Degradation unabhängig von der Aktivierung von Caspasen (Li *et al.*, 2001). In zellfreien Systemen führt die Inkubation von Zellkernen oder von Plasmid-DNA mit rekombinanter Endonuklease G zur DNA-Fragmentierung. Im Gegensatz zum Nematoden *C. elegans* konnte bisher allerdings kein synergistischer Effekt von AIF und Endonuklease G bezüglich DNA Fragmentierung beobachtet werden (Cregan *et al.*, 2004).

In gesunden Zellen ist AIF in den Mitochondrien lokalisiert, wo es wahrscheinlich als Oxidoreduktase agiert (Miramar *et al.*, 2001). Ein Hinweis, daß AIF ein elektronentransportierendes Protein ist,

ergibt sich aus der Sequenzhomologie, die AIF zu bakteriellen NAD-abhängigen Oxidoreduktasen aufweist (Ye *et al.*, 2002). Die physiologische Rolle von AIF in gesunden Zellen konnte durch Untersuchungen an Harlequin (HQ) Mäusen gezeigt werden, die aufgrund einer proviralen Insertion in den *aif* Genloкус eine um 80 % reduzierte AIF-Expression aufweisen (Klein *et al.*, 2002). Diese AIF-hypomorphen Mäuse besitzen eine reduzierte Toleranz gegenüber oxidativem Streß, was auf eine Vitalfunktion von AIF bei der Regulation oxidativer Prozesse hindeutet (Cande *et al.*, 2004). AIF-defiziente Zellen weisen eine geringere Menge und Aktivität des Atmungskettenkomplexes 1 auf, obwohl AIF kein Bestandteil dieses Polypeptidkomplexes ist. AIF könnte daher eine Rolle bei der Biogenese des Atmungskettenkomplexes 1 spielen (Vahsen *et al.*, 2004).

Nach heutigem Kenntnisstand agiert AIF abhängig von der intrazellulären Lokalisation entweder als Protein mit Vitalfunktion oder als proapoptotisches Signalmolekül. Diese Doppelfunktion von AIF ist vergleichbar mit den Aktivitäten von Cytochrom *c*, welches in den Mitochondrien am Elektronentransport beteiligt ist, in Folge apoptotischer Signale aber in das Cytoplasma freigesetzt wird und nach dieser Translokation als proapoptotisches Signalmolekül agiert. Im Gegensatz zu Cytochrom *c*, das essentiell ist, um Caspase-9 im „apoptosome“ zu aktivieren, induziert AIF Apoptose unabhängig von der Aktivierung von Caspasen.

1.4 Induktion von Apoptose durch cytotoxische Lymphocyten

Apoptotische Signalwege spielen eine wichtige Rolle bei der Eliminierung virusinfizierter, transformierter oder körperfremder Zellen durch das Immunsystem [Übersicht in: (Russell und Ley, 2002; Waterhouse *et al.*, 2004)]. Diese für den Körper gefährlichen Zellen werden durch cytotoxische Lymphocyten (CL) eliminiert. Hierzu zählen cytotoxische T-Zellen (CTL) und Natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese töten Zielzellen, indem sie Apoptose induzieren, wozu zwei voneinander unabhängige Mechanismen zur Verfügung stehen. Die Aktivierung des CD95 Signalweges mit Bildung des DISC und Aktivierung von Caspase-8 wird von den Effektorzellen durch Expression von CD95L induziert (vgl. Abschnitt 1.3.1). Fas vermittelte Apoptose spielt vermutlich in erster Linie bei immunregulatorischen Prozessen eine Rolle (Nagata, 1997). Ein weiterer Mechanismus ist die Sekretion von Effektormolekülen aus sogenannten cytotoxischen Vesikeln. Diese Effektoren sind das porenbildende Protein Perforin und die Granzyme.

1.4.1 Die Familie der Granzyme

Der Mensch besitzt fünf Granzyme: die Trypsin-ähnlichen Granzyme GrA und GrK, die Substrate hinter basischen Aminosäuren schneiden (Peitsch und Tschopp, 1994), Granzym B (GrB), das Substrate hinter einem Asp prozessiert (Poe *et al.*, 1991; Powers und Kam, 1995), GrM, das Substrate hinter Met oder anderen langen unverzweigten hydrophoben Seitenketten schneidet (Smyth *et al.*, 1993), und GrH, das eine Chymotrypsin-ähnliche Aktivität besitzt (Edwards *et al.*, 1999). In der Maus sind acht (GrA-GrG

und GrM), in Ratten sieben Granzyme (GrA-GrC, GrI, GrJ, GrK und GrM) bekannt (Kam *et al.*, 2000; Pham und Ley, 1997). Die am besten untersuchten Granzyme sind Granzym A und Granzym B. Obwohl beide Proteasen in Prozesse involviert sind, die zur Schädigung der chromosomalen DNA und/oder zur DNA-Fragmentierung führen, liegen ihrer Fähigkeit, Apoptose zu induzieren, unterschiedliche Signalwege zugrunde (Shresta *et al.*, 1999). Während GrB in der Zielzelle sehr schnell zur Induktion von Apoptose führt, ist GrA eher ein langsam agierendes Enzym (Shi *et al.*, 1992a; Shi *et al.*, 1992b). So zeigen CTLs aus GrB-defizienten Mäusen eine Verzögerung bei der Induktion von Apoptose in Zielzellen *in vitro*, sind aber bei längerer Inkubation von Effektor- und Zielzellen vergleichbar wirksam (Heusel *et al.*, 1994; Shresta *et al.*, 1995). CTLs aus GrA^{-/-}/GrB^{-/-} Mäusen sind dagegen nicht mehr in der Lage, Apoptose durch Sekretion des Inhalts cytotoxischer Vesikel zu induzieren (Simon *et al.*, 1997). Zu den Substraten von GrA zählt der Inhibitor der Nuklease NM23-H1 SET (Beresford *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2003a). Aktivierung dieser Nuklease führt zu DNA-Einzelstrangbrüchen. Weitere GrA-Substrate sind PHAP II, Lamine, Histon H1 und das DNA-Reparaturenzym Endonuklease I (Ape I) (Beresford *et al.*, 2001; Fan *et al.*, 2002; Fan *et al.*, 2003b; Zhang *et al.*, 2001a; Zhang *et al.*, 2001b). Die Spaltung dieser Substrate erfolgt in einer caspasenunabhängigen Weise (Lieberman und Fan, 2003). Für GrA sind ebenfalls nicht apoptotische Funktionen beschrieben. Dazu gehören die Proliferationsförderung von B-Lymphocyten, die Trombinaktivierung, die Induktion der Cytokinsekretion durch Monocyten, die Spaltung von Proteinen der extrazellulären Matrix (Proteoglykane und Typ IV Kollagene) sowie die Spaltung des Myelin-basischen-Proteins (Irmeler *et al.*, 1995; Nakamura *et al.*, 1993; Simon *et al.*, 1991; Sower *et al.*, 1996a; Sower *et al.*, 1996b; Suidan *et al.*, 1994; Vanguri *et al.*, 1993; Vettel *et al.*, 1991). Im Gegensatz hierzu ist die Serinprotease GrB durch direkte Spaltung von Caspasen in der Lage, sehr schnell und effizient Apoptose in Zielzellen zu induzieren.

1.4.2 Granzym B

GrB wird als inaktives Prä-Proenzym synthetisiert. Das N-terminale Signalpeptid wird im ER durch die Signalpeptidase entfernt. Im Golgi Apparat wird GrB über angefügte Mannose-6-phosphat Reste für den Transport zu Lysosomen markiert. In den Lysosomen wird ein N-terminales Dipeptid, welches die enzymatische Aktivität von GrB vollständig inhibiert, durch die lysosomale Dipeptidylpeptidase I (DPPI, auch: Cathepsin C) abgespalten (McGuire *et al.*, 1993; Pham und Ley, 1999). In dieser prozessierten Form ist GrB enzymatisch aktiv und wird nach dem Erkennen einer Zielzelle durch die cytotoxische Effektorzelle zusammen mit anderen Proteinen sekretiert. GrB besitzt als einzige Serinprotease Substratspezifität für Aspartat-Reste in der P₁ Position (Poe *et al.*, 1991; Powers und Kam, 1995) und ist damit in dieser Beziehung vergleichbar mit den Caspasen (vgl. Abschnitt 1.2.1). Durch Verwendung von „combinatorial substrate libraries“ konnte eine optimale GrB Erkennungssequenz identifiziert werden: Ile-Glu-Xxx-Asp (Darmon *et al.*, 1995; Shi *et al.*, 1996). GrB ist als einzige Protease neben den Caspasen in der Lage, Caspasen und Caspasen-Substrate zu spalten und so direkt in die apoptotischen Signalwege einzugreifen. Substrate von GrB sind Caspase-3, -7 und -8 (Atkinson *et al.*, 1998; Darmon *et al.*, 1996;

Darmon *et al.*, 1995; Medema *et al.*, 1997; Quan *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 1998). Für die Prozessierung von Caspase-7 durch GrB muß wahrscheinlich zunächst die Prodomäne der Procaspase-7 durch bereits aktivierte Caspase-3 entfernt werden (Yang *et al.*, 1998). *In vitro* konnten neben diesen Caspasen auch Caspase-6, -9 und -10 als GrB-Substrate identifiziert werden (Adrain *et al.*, 2004; Chinnaiyan *et al.*, 1996; Duan *et al.*, 1996; Fernandes-Alnemri *et al.*, 1996; Gu *et al.*, 1996; Muzio *et al.*, 1996; Talanian *et al.*, 1997; Van de Craen *et al.*, 1997). Durch die Fähigkeit, Caspase-3 direkt zu aktivieren, wirkt GrB auf unterster Ebene apoptotischer Signalwege und so auch unterhalb der meisten regulatorischen Mechanismen, durch die der Zelltod verhindert werden könnte.

Perforin ist ein porenbildendes Protein, das ursprünglich als eigentlicher Effektor cytotoxischer Vesikel angesehen wurde. Studien mit Knock-out Mäusen zeigten, daß Perforin der einzige Effektor cytotoxischer Vesikel ist, dessen Funktion nicht durch andere Effektoren ersetzt werden kann (Pardo *et al.*, 2004). Perforin^{-/-} Mäuse entwickeln sich normal, CLs aus diesen Tieren sind allerdings nicht in der Lage, Zielzellen über die Exocytose cytotoxischer Vesikel abzutöten. Aus diesem Grunde sind diese Tiere anfälliger für virale Infektionen und für die Entwicklung von Sarkomen, die durch das Kanzerogen Methylcholanthren induziert werden (Kagi *et al.*, 1994).

Ursprünglich wurde ein cytolytischer Mechanismus von Perforin und so eine durch Perforin vermittelte Zerstörung der Plasmamembran von Zielzellen angenommen (Young *et al.*, 1986) (vgl. Abb. 1.2 A). Heute ist allerdings bekannt, daß Perforin zusammen mit Granzymen bereits in sublytischen Konzentrationen zur effizienten Induktion von Apoptose in Zielzellen führt (Shi *et al.*, 2000; Trapani *et al.*, 1998). Die Bildung einer Perforinpore in der Zellmembran der Zielzelle, die den Granzymen den Zutritt zum Cytosol ermöglicht (Abb. 1.2 B), ist unwahrscheinlich, da Polyperforinkanäle nicht groß genug sind, um die Diffusion von Granzymen zu ermöglichen (Browne *et al.*, 1999). Zudem wird GrB in Form von Makromolekülkomplexen sekretiert, in denen es komplexiert mit Serglycin vorliegt. Das Molekulargewicht dieser Komplexe beträgt mehr als 300 kDa (Metkar *et al.*, 2002; Raja *et al.*, 2002). Neuere Daten zeigen, daß GrB durch Bindung an bestimmte Zelloberflächenstrukturen und so über rezeptorvermittelte Endocytose in Zielzellen aufgenommen wird (vgl. Abb. 1.2 C) (Andrade *et al.*, 2004). Nach der Aufnahme befindet sich die Protease dann in Vesikeln, aus denen sie freigesetzt werden muß, um Apoptose induzieren zu können.

Diese Freisetzung in das Cytosol erfordert die Anwesenheit von Perforin oder anderer endosomolytischer Agenzien. Für dieses Modell der perforinvermittelten Freisetzung von GrB in das Cytosol der Zielzelle spricht auch, daß Perforin funktionell durch replikationsinkompetente Formen von Adenovirus (Froelich *et al.*, 1996) sowie verschiedene membranaktive bakterielle Toxine (Browne *et al.*, 1999) ersetzt werden kann. Mikroinjektion von GrB in das Cytosol von Zellen hingegen führt zur Induktion von Apoptose in Abwesenheit von Perforin (Pinkoski *et al.*, 1998).

Als Zielrezeptoren für GrB auf der Zelloberfläche wurde der Mannose-6-phosphat/„insulin-like growth factor II“ (IGFII) Rezeptor beschrieben, der gereinigtes GrB binden und internalisieren kann (Motyka *et al.*, 2000). Ursprünglich wurde auch beschrieben, daß dieser Rezeptor essentiell für die durch

GrB induzierte Apoptose ist. Aus heutiger Sicht scheint die Expression des Mannose-6-phosphat Rezeptors auf Zielzellen zwar förderlich, aber nicht notwendig für die Aufnahme von GrB in Zellen zu sein (Trapani *et al.*, 2003). In einer neueren Arbeit wurde die Aufnahme von GrB unabhängig von spezifischen Rezeptoren durch Mikropinocytose beschrieben (vgl. Abb. 1.2 D) (Trapani *et al.*, 2003).

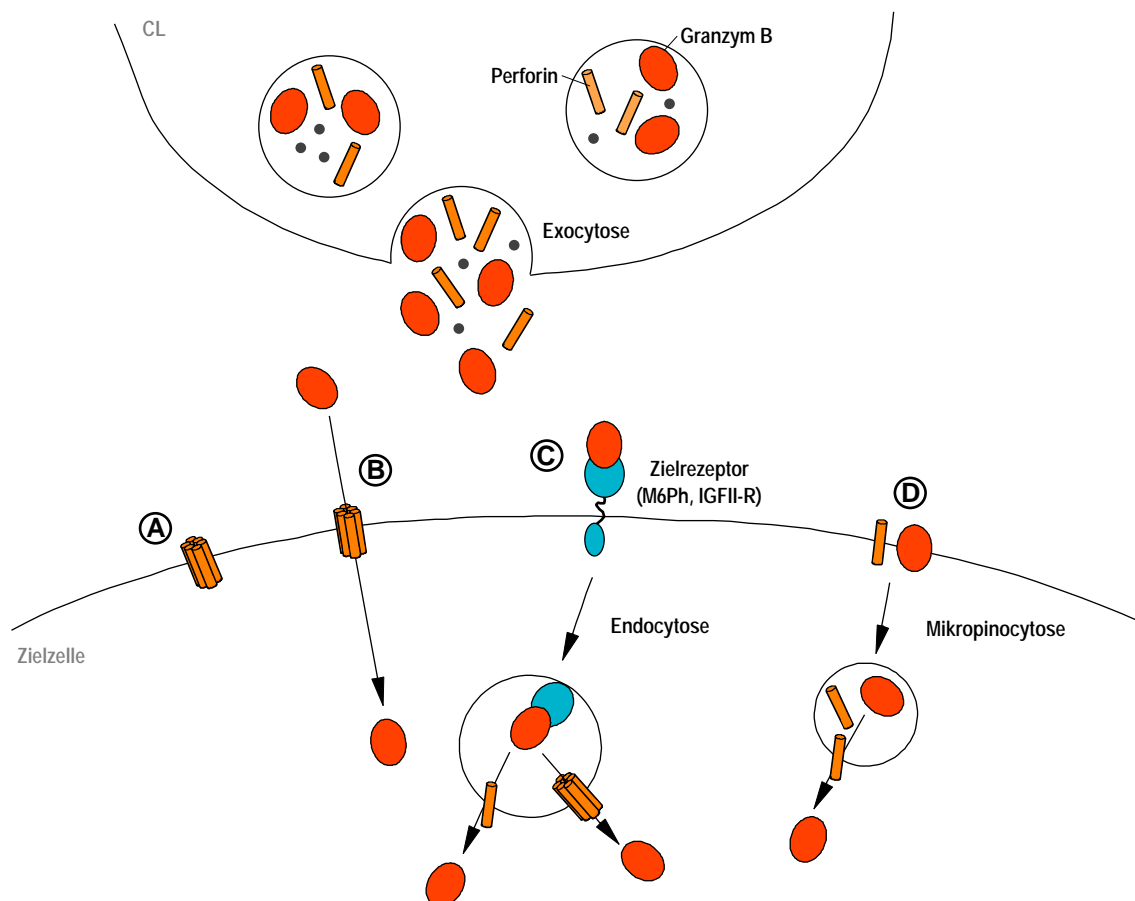


Abb. 1.2 | **Durch Granzym B und Perforin vermittelte Cytotoxizität.** (A) Ursprünglich wurde Perforin als eigentlicher Effektor cytotoxischer Lymphocyten und ein Modell der perforininduzierten Lyse angenommen, bei der Perforin Poren in der Cytoplasmamembran der Zielzelle bildet. (B) Da jedoch auch sublytische Konzentrationen von Perforin zusammen mit GrB zur Induktion von Apoptose ausreichend sind, wurde ein Modell vorgeschlagen, bei dem GrB durch Perforinporen in das Cytoplasma der Zielzelle gelangt. (C+D) Neuere Arbeiten schlagen eine rezeptorvermittelte Aufnahme von GrB (C) oder die Aufnahme durch Mikropinocytose in die Zielzellen vor (D). In diesen Modellen (C+D) ist Perforin für die Freisetzung von GrB aus dem endosomalen Kompartiment erforderlich.

1.4.3 Mechanismen der Granzym B induzierten Apoptose

Durch GrB induzierte Apoptose in Zielzellen erfolgt sowohl in caspasenabhängiger als auch in caspasenunabhängiger Form (Andrade *et al.*, 2004; Sarin *et al.*, 1997; Talanian *et al.*, 1997; Waterhouse *et al.*, 2005). Dies ist physiologisch sinnvoll, um CLs auch eine effiziente Eliminierung von virusinfizierten Zellen zu ermöglichen, die viral kodierte Caspaseinhibitoren exprimieren. Apoptose kann durch GrB auch dann induziert werden, wenn Caspasen durch den chemischen Caspaseinhibitor

zVAD-fmk (Pinkoski *et al.*, 2000; Thomas *et al.*, 2000) oder durch den viralen Caspaseinhibitor „cytokine response modifier A“ inhibiert sind (Sharif-Askari *et al.*, 2001). Neuere Daten zeigen, daß für die vollständige Aktivierung von Caspase-3 durch GrB nicht nur die direkte Aktivierung der Caspase-3 durch proteolytische, GrB vermittelte Spaltung nötig ist, sondern auch die Aufhebung des neutralisierenden Effekts der Caspaseinhibitoren (IAPs) durch die Freisetzung der IAP-bindenden Proteine Smac/DIABLO und HtrA2/Omi aus dem mitochondrialen Intermembranraum (Sutton *et al.*, 2003).

Die Tatsache, daß GrB auch unabhängig von Caspasen-Aktivierung Apoptose induzieren kann, läßt sich mit der direkten Spaltung von Caspasen-Substraten durch GrB erklären. Eines dieser Substrate ist das „BH-3only“ Protein Bid (Alimonti *et al.*, 2001; Barry *et al.*, 2000; Waterhouse *et al.*, 2005). GrB kann ebenso wie Caspase-8 Bid spalten, entweder direkt oder durch vorherige Aktivierung von Caspase-8. Spaltung von Bid führt zur Freisetzung proapoptotischer Proteine aus dem mitochondrialen Intermembranraum, was durch Bak und Bax vermittelt wird (vgl. Abschnitt 1.3.2). Die Proteolyse von Bid durch GrB ist ein sehr frühes Ereignis der GrB vermittelten Apoptose und erfolgt vor der Spaltung von Caspase-3 und ICAD (Pinkoski *et al.*, 2001). Die Notwendigkeit der Spaltung von Bid für die GrB induzierte Apoptose wird widersprüchlich diskutiert (Adrain *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2001; Wang *et al.*, 2001; Waterhouse *et al.*, 2005). Zudem ist unklar, inwieweit Bcl-2 die durch GrB induzierte Apoptose inhibiert (Alimonti *et al.*, 2001; Davis *et al.*, 2000; Pinkoski *et al.*, 2001).

Ein weiteres Substrat von GrB, dessen Spaltung zur caspasenunabhängigen Induktion von Apoptose durch GrB führt, ist der bereits genannte Inhibitor der Caspasen-aktivierten DNase ICAD. Spaltung von ICAD führt zur nukleären Translokation von CAD und schließlich zur Degradation chromosomaler DNA (Sharif-Askari *et al.*, 2001; Thomas *et al.*, 2000) (vgl. Abschnitt 1.2.2). Weitere GrB-Substrate sind Proteine, die an der DNA-Reparatur beteiligt sind: die katalytische Untereinheit der DNA-abhängigen Proteinkinase (DNA-PK_{CS}), das Genprodukt des „x-ray cross-complementation group 4 gene“ (XRCC-4) und die poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) (Froelich *et al.*, 1996). Zu den Substraten von GrB gehören auch das U1-70k Protein, welches für die Bildung des „spliceosome“ essentiell ist, Topoisomerase-1, Mi-2 des „nucleosome remodeling complex“, einige Proteine der Golgin Familie und das „nuclear mitotic apparatus protein“ (NuMA). Außerdem wurden Lamin und das aktinbindende Strukturprotein Filamin als Substrate von GrB identifiziert (Browne *et al.*, 2000; Choy *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2001a). Die Fähigkeit von GrB, Apoptose durch direkte Aktivierung von Caspasen, durch Aktivierung des mitochondrialen (intrinsischen) Signalweges sowie durch Spaltung von Caspase-Substraten zu induzieren, ist für den Organismus sehr wahrscheinlich vorteilhaft, da dadurch Zelltod auch bei Blockade eines dieser Signalwege eintritt (Andrade *et al.*, 2004).

Das einzige bekannte humane Protein, das GrB direkt inhibiert, ist der zur Familie der Serpine gehörende Proteinase Inhibitor-9 (PI-9) (Trapani, 2001). PI-9 wird in lymphoiden Geweben, immunprivilegierten Geweben und T-Lymphocyten, sowie in reifen dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert (Buzza *et al.*, 2001; Medema *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1996). In hohen Konzentrationen ist PI-9 in cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen vorhanden und dient dort als Eigenschutzmechanismus gegen

sekretiertes oder intrazellulär fehlgeleitetes GrB. Darüber hinaus konnte die Expression von PI-9 in diversen humanen Tumoren beobachtet werden, woraus in einigen Fällen eine partielle Resistenz dieser Tumorzellen gegenüber CTL vermittelter Apoptose *in vitro* und *in vivo* resultierte (Classen *et al.*, 2004; Medema *et al.*, 2001). Eine neuere Arbeit zeigt, daß GrM, eine Serinprotease, die ausschließlich in sekretorischen Vesikeln von Natürlichen Killerzellen gefunden wird, PI-9 *in vitro* spezifisch hydrolysiert und so inaktiviert (Mahrus *et al.*, 2004).

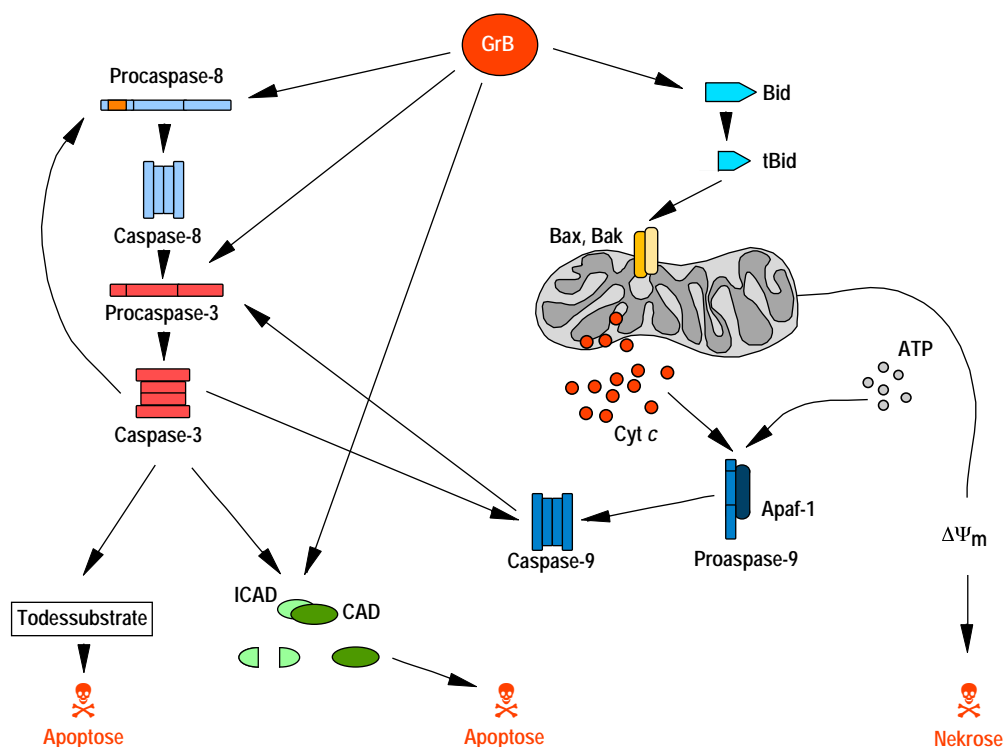


Abb. 1.3 | **Mechanismen der durch Granzym B induzierten Apoptose.** GrB induziert den apoptotischen Zelltod durch Aktivierung unterschiedlicher Signalwege. Dies geschieht durch direkte Spaltung und Aktivierung der Effektorcaspase-3, aber auch durch Spaltung der Initiatorcaspase-8, deren Aktivierung ebenfalls die Prozessierung von Caspase-3 zur Folge hat. Die Spaltung von Bid durch GrB führt zur Freisetzung von Cytochrom *c* und anderer proapoptotischer Moleküle aus den Mitochondrien. Cytosolisches Cytochrom *c* ist essentiell für die Aktivierung von Caspase-9 im „apoptosome“. Caspase-9 aktiviert ebenfalls Caspase-3. Ein weiterer Mechanismus der durch GrB induzierten Apoptose, der zumindest initial unabhängig von der Aktivierung von Caspasen verläuft, ist die Spaltung von ICAD und der daraus resultierenden CAD vermittelten Fragmentierung der chromosomalen DNA.

1.5 Voraussetzungen für das Entstehen von Tumoren

Die Entstehung von Tumoren ist ein progressiver Prozeß, bei dem sich Zellen durch Mutationen genetisch so verändern, daß sie schneller proliferieren können als zuvor. Damit verläuft die Tumorentstehung formal analog zum Darwinschen Evolutionsmodell (Foulds, 1954; Hanahan und Weinberg, 2000; Nowell, 1976).

Im Folgenden sind notwendige Eigenschaften von Tumorzellen beschrieben und beispielhaft Mecha-

nismen aufgezeigt, durch die Tumorzellen diese Eigenschaften erwerben (vgl. Abb. 1.4).

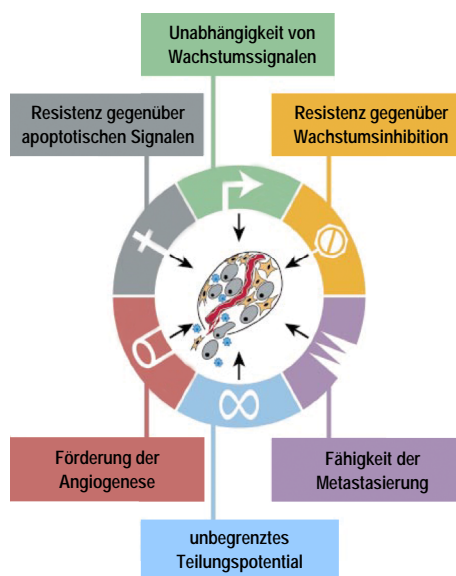


Abb. 1.4 | **Erworbene Eigenschaften von Tumorzellen.** Tumorzellen erlangen durch schrittweise Akkumulation von Mutationen Eigenschaften, die den transformierten Phänotyp ausmachen. Erläuterungen hierzu im Text. [Abb. aus: (Hanahan und Weinberg, 2000), modifiziert]

Unabhängigkeit von externen Wachstumsfaktoren erlangen Tumorzellen z. B. durch Überexpression von Wachstumsfaktorrezeptoren auf der Zelloberfläche oder durch die autokrine Aktivierung dieser Rezeptoren. Mutation der GTPase Ras, die zur konstitutiven Aktivierung des MAP-Kinase Signalwegs führt, erlaubt gar eine dauerhafte Aktivierung dieses Signalwegs in Abwesenheit von Rezeptoraktivierung und so in Abwesenheit von Wachstumsfaktoren.

Zusätzlich müssen Tumorzellen in der Lage sein, antiproliferativen Signalen aus der Umgebung zu entgehen. Viele dieser Signale werden durch das Retinoblastom-Protein pRb kontrolliert. In hypophosphorylierter Form hat pRb einen antiproliferativen Effekt und wirkt über die Blockierung des E2F Transkriptionsfaktors, der die Expression zahlreicher Gene kontrolliert, die für die Zellzyklusprogression von der G1 in die S-Phase essentiell sind (Weinberg, 1995). Mutationen in pRb erlauben die Proliferation auch in Gegenwart antiproliferativer Signale.

Eine weitere Eigenschaft maligne transformierter Zellen ist die Fähigkeit, unbegrenzt zu proliferieren. In gesunden Zellen führt die permanente Verkürzung der Telomere zu einer Begrenzung der maximalen Teilungsfähigkeit der Zelle. Durch verstärkte Expression des Enzyms Telomerase oder durch interchromosomale Rekombination der Chromosomenenden sind Tumorzellen in der Lage, die Länge der Telomere konstant zu halten und so den Zellzyklus unbegrenzt häufig zu durchlaufen (Bryan und Cech, 1999; Bryan *et al.*, 1995; Shay und Bacchetti, 1997).

Bei der Ausbildung eines soliden Tumors ist die ausreichende Versorgung der schnell proliferierenden

Zellen mit Sauerstoff und Nährstoffen essentiell. Tumorzellen fördern hierbei die Angiogenese durch Sekretion angiogener Faktoren wie VEGF und/oder FGF. Einen weiteren möglichen Mechanismus stellt die reduzierte Expression endogener Inhibitoren der Angiogenese wie Thrombospondin-1 oder β -Interferon durch maligne transformierte Zellen dar (Hanahan und Folkman, 1996; Singh *et al.*, 1995; Volpert *et al.*, 1997).

Die Bildung von Metastasen ist die Ursache von 90 % aller krebsbedingter Todesfälle (Sporn, 1996). Das homophile Zell/Zell-Adhäsionsmolekül E-Cadherin wird auf Epithelzellen ubiquitär exprimiert und stellt in gesunden Zellen einen Suppressor von Invasion und Metastasierung dar. Ein Verlust der E-Cadherin Funktion wird bei der Mehrheit von metastasierenden Tumorzellen epithelialen Ursprungs beobachtet (Christofori und Semb, 1999).

Die Eigenschaft, Apoptosesignalen zu entgehen, ist ein weiteres allgemeines Merkmal von Tumorzellen (Hanahan und Weinberg, 2000), und die deregulierte Proliferation von Zellen alleine ist für die Entstehung von Tumoren nicht ausreichend. Die Überexpression der wachstumsfördernden Onkoproteine c-Myc, E1A oder E2F1 z. B. sensitiviert Zellen sogar gegenüber Apoptose (Evan *et al.*, 1992). Dagegen verhindert die gleichzeitige Überexpression antiapoptotischer Proteine oder die Inaktivierung proapoptotischer Proteine die Induktion von Apoptose und erlaubt so das entartete Wachstum dieser Zellen. Damit ein Tumor entstehen und metastasieren kann, müssen daher die regulären zellulären Antworten auf hyperproliferative Signale, die normalerweise die Induktion von Apoptose zur Folge haben und Zellen am unbegrenzten Wachstum hindern (wie Sauerstoffmangel, Mangel an Nährstoffen oder veränderte Zelladhäsion), umgangen werden. Hieraus kann ein allgemeingültiger Mechanismus abgeleitet werden, nach dem Zellen, die aktivierte Onkoproteine überexprimieren, durch Apoptoseinduktion eliminiert werden (Hanahan und Weinberg, 2000). Ein solcher Mechanismus ist physiologisch sinnvoll, um transformierte Zellen zu eliminieren und so deren weitere Entwicklung zu Tumorzellen zu verhindern.

Resistenz gegenüber apoptotischen Signalen erlangen Tumorzellen beispielsweise durch Überexpression der antiapoptotischen Onkoproteine Bcl-2 und Bcl-x_L (vgl. Abschnitt 1.3.2). Tumore entstehen damit nicht allein durch die Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation und Apoptose zugunsten einer zu hohen Proliferationsrate, sondern durch den gleichzeitigen Verlust der Fähigkeit der Zellen auf Apoptosesignale zu reagieren (Evan und Vousden, 2001).

Für die therapeutische Behandlung von Tumoren stehen damit prinzipiell zwei Ansätze zur Verfügung. Einerseits die Induktion von Apoptose trotz bestehender inhibitorischer Mechanismen des Tumors, die zur Vernichtung der entarteten, unkontrolliert proliferierenden Zellen führt; andererseits eine Wiederherstellung der defekten Regulationsmechanismen, die die Eliminierung der Zellen durch die eigenen wiedergewonnenen Kontrollmechanismen zur Folge hat.

In klassischen radio- und chemotherapeutischen Ansätzen ist das Ziel eine möglichst vollständige Abtötung der nach einer operativen Entfernung von Tumoren im Körper des Patienten verbliebenen Tumorzellen. Dies wird häufig durch Bestrahlung mit DNA-schädigender, radioaktiver Strahlung im Bereich des entfernten Tumors bewirkt. Bei der Verwendung von Cytostatika wird versucht, Tumorzellen

durch die systemische Applikation einer Kombination cytotoxischer und cytostatischer Substanzen abzutöten (Mutschler *et al.*, 2001). Als Cytostatika werden hierzu DNA-alkylierende Reagenzien, Nukleotidanaloga, Topoisomerasehemmer, Antimetabolite sowie pflanzliche Alkaloide verwendet, die die Funktion des Cytoskeletts beeinflussen. Der Einsatz von Cytostatika ist aufgrund ihrer geringen Selektivität für Tumorzellen jedoch limitiert, und bei der Behandlung treten erhebliche Nebenwirkungen auf, die v. a. aus der Cytotoxizität gegenüber gesunden, schnell proliferierenden Zellen z. B. des Knochenmarks, des Gastrointestinaltrakts und der Haarfollikel resultieren (Allen, 2002). Je nach Art, Dosis und Dauer der Therapie können (vorübergehend) eher leichte, unangenehme Nebenwirkungen (Übelkeit, Schmerzen, Haarausfall etc.) für den Patienten auftreten. Eine aggressive Chemotherapie kann aufgrund ihrer Toxizität für gesunde Körperzellen jedoch auch schwere Nebenwirkungen nach sich ziehen, die bis zum Tod des Patienten führen können. Dies macht deutlich, daß es das Hauptanliegen der Krebsforschung sein muß, alternative Behandlungsmethoden zu entwickeln, die bei einer deutlichen Reduzierung von Nebenwirkungen eine effizientere, zielgenaue Zerstörung der Tumorzellen ermöglichen. Eine gerichtete Tumorthherapie, die bei möglichst geringer Schädigung gesunder Gewebe Tumorzellen restlos abtötet, ist das Ziel der modernen Krebsforschung.

1.5.1 Gerichtete Therapiekonzepte

Ein rationaler Ansatz zur Therapie von Krebserkrankungen ist die gezielte Korrektur einzelner Defekte, die kausal mit der malignen Transformation zusammenhängen. Ein gentherapeutischer Ansatz besteht beispielsweise in dem Wiedereinführen des *p53* Tumorsuppressorgens in Tumorzellen, die kein funktionelles P53 exprimieren. Hierzu wird ein replikationsdefizientes Adenovirus (SCF 58500, Ad-*p53*) eingesetzt (Liu *et al.*, 1994; Vecil und Lang, 2003). Alternativ hierzu wird ein cytolytisches Virus klinisch untersucht, das selektiv in Zellen repliziert, die kein funktionelles P53 besitzen (ONYX-015, Onyx Pharmaceuticals) (Khuri *et al.*, 2000) [Übersicht: (Chiocca, 2002)]. Andere Therapien, die derzeit in der klinischen Entwicklung sind, zielen ab auf die Inhibition überexprimierter Onkoproteine wie Bcl-2 oder c-Myc durch Antisense Oligonukleotide (Oblimersen, Aventis/Genta; Oncomyc-NG, AVI BioPharma) [Übersicht: (Dean und Bennett, 2003)]. Mit weiteren therapeutischen Strategien wird versucht, Apoptose-signalwege nicht indirekt, wie durch klassische Cytostatika, sondern direkt zu aktivieren, um so eventuelle Resistenzmechanismen zu umgehen. Hierzu wird derzeit TRAIL, ein Ligand der TNF-Familie (vgl. Abschnitt 1.3.1) für den möglichen Einsatz in der Tumorthherapie untersucht. Bindung von TRAIL an Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie bewirkt die Aktivierung von Caspase-8 und führt zur Aktivierung des extrinsischen Apoptose-Signalwegs. TRAIL besitzt intrinsische Spezifität für Tumorzellen, nicht-transformierte Zellen hingegen sind relativ resistent gegenüber TRAIL-induzierter Apoptose (Ashkenazi, 2002). Die molekularen Grundlagen dieser Spezifität von TRAIL für Tumorzellen sind nicht bekannt. Im physiologischen Kontext spielt TRAIL eine wichtige Rolle bei der Tumorumwehr durch das Immunsystem (Cretney *et al.*, 2002). Für den klinischen Einsatz rekombinanter Formen von TRAIL sind jedoch weitere Untersuchungen nötig.

Andere Tumorzell-spezifische therapeutische Ansätze, die entwickelt werden, um die Schädigung von gesundem Gewebe bei systemischer Applikation zu vermeiden, basieren auf der Beobachtung, daß Tumorzellen häufig ein anderes Expressionsmuster an Zelloberflächenmolekülen aufweisen als normale Zellen. Ein Beispiel für solche tumorassoziierten Antigene sind Mitglieder der ErbB Rezeptor Familie (Yarden und Sliwkowski, 2001), die zu den Rezeptortyrosinkinasen gehören.

1.5.2 Rezeptoren der ErbB Familie

Zur Familie der ErbB Rezeptoren zählen der „epidermal growth factor receptor“ EGFR (ErbB), ErbB2 (HER2/Neu), ErbB3 (HER3) und ErbB4 (HER4) (Yarden und Sliwkowski, 2001). Die Rezeptoren dieser Familie bestehen aus einer glycosylierten extrazellulären Domäne, einer die Membran einfach durchspannenden Domäne und einer cytoplasmatischen Domäne mit Tyrosinkinaseaktivität. ErbB Rezeptoren werden in vielen Geweben epithelialen, mesenchymalen und neuronalen Ursprungs exprimiert, wo sie grundlegende zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration, Differenzierung und Apoptose steuern. Die Liganden dieser Rezeptoren, die die Aktivität der Tyrosinkinasen regulieren, werden als Transmembranproteine synthetisiert und durch proteolytische Spaltung freigesetzt (Massague und Pandiella, 1993).

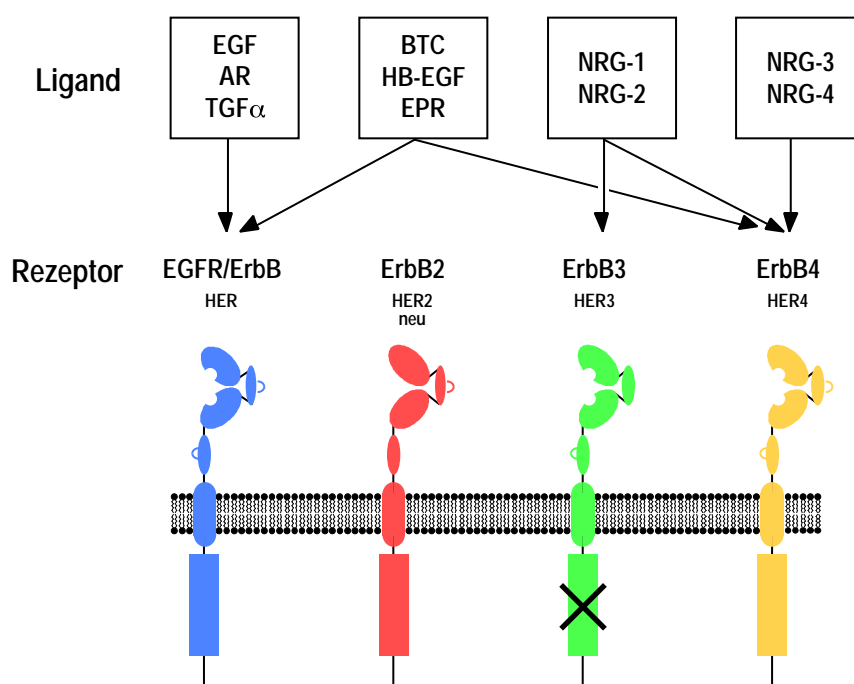


Abb. 1.5 | **Schematische Darstellung der ErbB Rezeptoren und ihrer Liganden.** (nach: Cord Hartmann, unveröffentlicht)

Vier Gruppen von Liganden binden an Mitglieder der ErbB/EGFR Rezeptorfamilie und sind an der Ausbildung unterschiedlicher Rezeptorhomo- und -heterodimere beteiligt. Epidermal growth factor (EGF), Amphiregulin (AR) und transforming growth factor α (TGF α) binden an EGFR; Betacellulin (BTC), Heparin-binding EGF (HB-EGF) und Epiregulin (EPR) binden an EGFR und ErbB4; Neuregulin-1 (NRG-1) und NRG-2 binden an ErbB3 und ErbB4; NRG-3 und NRG-4 binden an ErbB4.

Ligandenbindung und Rezeptordimerisierung führen zur Aktivierung der Tyrosinkinaseaktivität, wodurch spezifische Tyrosinreste der cytoplasmatischen Domäne der ErbB Rezeptoren autophosphoryliert werden, die daraufhin mit intrazellulären Signalmolekülen interagieren (Gschwind *et al.*, 2001). Die Diversität der Signale, die durch ErbB Rezeptoren induziert werden, ergibt sich aus der ligandeninduzierten Bildung unterschiedlicher Rezeptorhomo- bzw. Heterodimere (vgl. Abb. 1.5) und wird durch unterschiedliche Expressionsniveaus der einzelnen Rezeptoren in verschiedenen Geweben und Zelltypen vergrößert (Yarden und Sliwkowski, 2001).

Ursprünglich wurde angenommen, daß Liganden der ErbB Rezeptoren bivalent sind und die Rezeptordimerisierung dadurch erleichtern, daß ein Rezeptor mit hoher Affinität und ein Rezeptor mit niedriger Affinität durch den Liganden gebunden wird (Beerli und Hynes, 1996; Tzahar *et al.*, 1997). Die Kristallstruktur der extrazellulären Domäne des EGFR in seiner inaktiven Konformation (Ferguson *et al.*, 2003) sowie die von verkürztem EGFR komplexiert mit EGF oder TGF α (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002) unterstützen dieses Modell der simultanen Bindung eines Liganden an beide Rezeptoren eines Dimers jedoch nicht. In Abwesenheit von Ligand liegt EGFR in einer inhibierten Konformation vor. Durch intramolekulare Interaktionen sind die Aminosäureseitenketten, die an der Rezeptordimerisierung beteiligt sind, in dieser Konformation verdeckt (Ferguson *et al.*, 2003). Um den Rezeptor zu aktivieren, fördert EGF eine Rezeptorkonformation, in der diese Seitenketten exponiert sind und mit einem anderen aktivierten Rezeptormonomer interagieren können (Schlessinger, 2002). Im resultierenden aktivierten Rezeptordimer ist jeder Ligand exklusiv an ein Rezeptormonomer gebunden (Garrett *et al.*, 2002; Ogiso *et al.*, 2002). Im Gegensatz zu den anderen ErbB Rezeptoren wurde für ErbB2 kein hochaffiner Ligand identifiziert. ErbB2 stellt allerdings den bevorzugten Dimerisierungspartner der anderen ErbB Rezeptoren dar. Diese seit längerer Zeit bekannte Eigenschaft von ErbB2 (Graus-Porta *et al.*, 1997; Tzahar *et al.*, 1996) kann aus einer strukturellen Besonderheit dieses Rezeptors abgeleitet werden. Die Kristallstrukturen der verkürzten und der vollständigen extrazellulären Domäne von ErbB2 zeigen, daß der Rezeptor in Abwesenheit eines Liganden bereits in einer Konformation vorliegt, die eine Dimerisierung mit anderen aktivierten Rezeptoren ermöglicht (Cho *et al.*, 2003; Garrett *et al.*, 2003). Diese Konformation von ErbB2 unterscheidet sich deutlich von den Konformationen, die EGFR und ErbB3 in Abwesenheit von Ligand einnehmen, und ist vergleichbar mit der ligandeninduzierten aktiven Konformation des EGFR.

Auf der Oberfläche zahlreicher Tumore epithelialen Ursprungs ist eine übermäßig starke Expression von Rezeptoren der ErbB Familie, insbesondere aber von EGFR und ErbB2 zu beobachten (vgl. Tab. 1.1) (Slamon *et al.*, 1987), die mit einer schlechten Prognose für den Patienten korreliert (Hynes und Stern, 1994; Salomon *et al.*, 1995; Slamon *et al.*, 1987). Wegen des kausalen Zusammenhangs zwischen maligner Transformation und Überexpression von Erb Rezeptoren auf Tumorzellen und ihrer guten Zugänglichkeit auf der Zelloberfläche stellen die Mitglieder der ErbB Rezeptorfamilie geeignete Antigene für eine zielgerichtete Tumorthherapie dar (Wels *et al.*, 1996).

Rezeptor	Dysregulation	Tumorentität
EGFR	Überexpression	Kopf und Hals, Brust, Blase, Prostata, Niere, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Gliom
	Mutation	Ovarien, Brust, nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom, Gliom, Medulloblastom
ErbB2	Überexpression	Brust, Lunge, Pankreas, Kolon, Ösophagus, Endometrium, Zervix
ErbB3	Expression	Brust, Kolon, Magen, Prostata, andere Karzinome
	Überexpression	Orales Plattenepithelkarzinom
ErbB4	verminderte Expression	Brust, Prostata
	Expression	Medulloblastom im Kindesalter

Tab. 1.1 | Expression von ErbB-Rezeptoren in humanen Tumoren. [aus: (Yarden und Sliwkowski, 2001)]

1.5.3 ErbB Rezeptoren als Zielstrukturen für eine gerichtete Therapie

Ein therapeutischer Ansatz, der sich die Abhängigkeit der Tumorzelle von mitogenen und anti-apoptotischen Signalen zunutze macht, wie sie auch durch ErbB Rezeptoren vermittelt werden, besteht in der selektiven Blockade der intrazellulären Rezeptortyrosinkinase durch Kompetition der ATP Bindung mittels Tyrosinkinaseinhibitoren (Arteaga, 2003; Mendelsohn, 2003). Zur Zeit werden einige ErbB spezifische Tyrosinkinaseinhibitoren verschiedener Hersteller wie z. B. ZD 1839 (Iressa; AstraZeneca Pharmaceuticals LP, Wilmington, DE, USA), OSI-744 (Tarceva; OSI Pharmaceuticals, Uniondale, NY, USA; Genentech, South San Francisco, CA, USA; Hoffman La-Roche, Basel, CH), PKI166 (Novartis Pharma, Basel, CH) und CI-1033 (Pfizer Pharmaceuticals, Groton, CT, USA) in klinischen Studien auf ihre Eignung für einen therapeutischen Einsatz untersucht (Goel *et al.*, 2002; Modi und Seidman, 2002).

Neben der Blockade der intrazellulären Kinasedomäne durch Tyrosinkinaseinhibitoren stellt der Einsatz monoklonaler Antikörper mit Spezifität für ErbB Rezeptoren einen weiteren vielversprechenden Ansatz dar, um mit den transformierenden Signalen dieser tumorassoziierten Antigene zu interferieren [Übersicht: (Groner *et al.*, 2004; Hinoda *et al.*, 2004)]. Die Wirkmechanismen monoklonaler Antikörper (vgl. Abb. 1.6) sind vielseitig und können die Blockade der Ligandenbindung, die Inhibition der

Rezeptordimerisierung, einen verstärkten Rezeptorabbau und die Rekrutierung von Immuneffektorzellen einschließen. Der weitgehend humanisierte monoklonale Antikörper C225 (Cetuximab/Erbitux; Imclone Systems, Sommerville, NJ, USA) ist seit Mitte 2004 in den Staaten der Europäischen Union zugelassen. Die Zulassung bezieht sich auf eine Kombination von C225 mit dem Topoisomerase-I-Inhibitor Irinotecan als Zweitbehandlung („Second-Line“-Therapie) von Patienten mit metastasierendem Darmkrebs, die auf die Standard-Chemotherapie mit Irinotecan nicht mehr ansprechen. In den USA ist C225 auch für den Einsatz in der Monotherapie zugelassen.

C225 bindet an den extrazellulären Teil des EGF-Rezeptors und kompetiert mit der Bindung der Liganden EGF und TGF α . Außerdem induziert die Bindung von C225 an den EGF-Rezeptor eine Rezeptordimerisierung. Dies kann zu einer verstärkten Internalisierung, Degradation und Herunterregulation des Rezeptors führen. Neben der antagonistischen Aktivität von C225 rekrutieren gebundene Antikörper Fc-Rezeptor exprimierende Immuneffektorzellen und lösen damit Aktivität gegenüber den EGF-Rezeptor überexprimierenden Zellen aus („antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity“, ADCC) (Arteaga, 2003; Mendelsohn, 2003).

Die Wirksamkeit von C225 als Monotherapie und in Kombination mit Cytostatika wurde in zahlreichen klinischen Studien untersucht (Cunningham *et al.*, 2004). Als häufige Nebenwirkung wurde dabei das Auftreten eines akneartigen Hautausschlags beschrieben, der bei 77 % der 813 in 21 Studien behandelten Patienten auftrat. Eine Phase III Studie mit Kopf- und Halskrebs wurde mit einer Kombination aus Cisplatin und C225 oder Cisplatin und Placebo durchgeführt. Dabei zeigten 22,6 % der Patienten, die mit C225 und Cisplatin behandelt waren, einen partiellen Therapieerfolg gegenüber 9,3 % in der Cisplatin-Gruppe (Mendelsohn, 2002). Sowohl für die kombinierte Behandlung mit Cisplatin als auch für die Behandlung von Kopf-Hals-Tumoren ist C225 in den Staaten der EU allerdings bisher nicht zugelassen.

Herceptin (Hoffman La-Roche, Basel, CH) ist die humanisierte Form des murinen monoklonalen Antikörpers 4D5, dessen komplementaritätsbestimmenden Regionen auf ein humanes IgG $_1$ κ Gerüst übertragen wurden, um unerwünschte Immunreaktionen gegen den murinen Fc Teil des 4D5 Antikörpers zu verhindern. Der Antikörper ist seit dem Jahr 2000 in den Staaten der Europäischen Union zugelassen. Herceptin bindet nahe der Transmembrandomäne von ErbB2, was zur Herunterregulation des ErbB2 Moleküls auf der Zelloberfläche und zur Induktion des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p27^{Kip1} führt, wodurch die Zahl der Zellen in der S-Phase verringert wird (Yarden, 2001).

Die Aktivierung und Rekrutierung von Immuneffektorzellen zu ErbB2-überexprimierenden Tumoren könnte wie im Falle von C225 zum Wirkungsmechanismus von Herceptin beitragen (Clynes *et al.*, 2000). Derzeit sind vier Phase III Studien mit insgesamt über 13.500 teilnehmenden Patienten geplant, in denen die Wirksamkeit einer Kombination von Herceptin mit Standard-Chemotherapie untersucht werden soll (Baselga *et al.*, 2004). Als unerwartete Nebenwirkung von Herceptin traten in einer Phase III Studie, in der die Wirksamkeit einer Kombination von Herceptin und Chemotherapie (Doxorubicin und Cyclophosphamid) an Patientinnen mit metastasierendem Brustkrebs untersucht wurde,

bei 27 % der Patientinnen Funktionsstörungen des Herzens auf (Slamon *et al.*, 2001). Die Ansprechrare betrug in dieser Studie 50 %. Kardiale Funktionsstörungen wurden ebenfalls in anderen Studien mit Herceptin beobachtet (Perez und Rodeheffer, 2004).

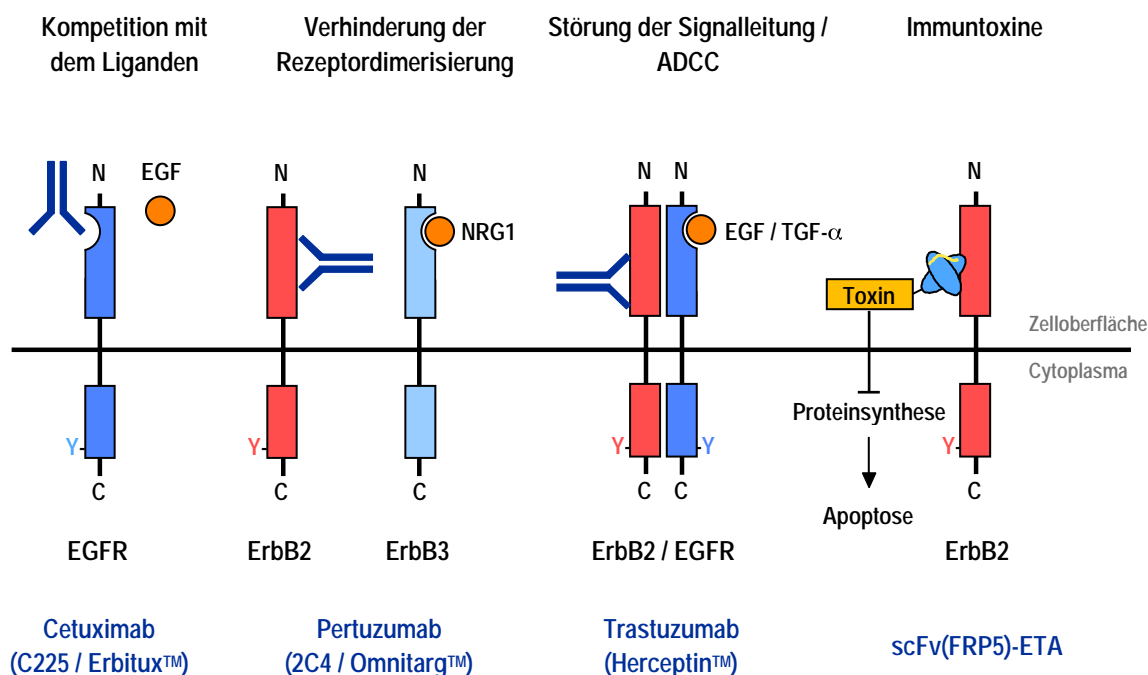


Abb. 1.6 | **Mechanismen ErbB spezifischer therapeutischer Antikörper.** [nach: (Groner *et al.*, 2004)]

Cetuximab ist ein antagonistischer EGFR spezifischer Antikörper, der mit der Ligandenbindung kompetiert. Der Antikörper verhindert so die Aktivierung des Rezeptors durch die Liganden TGF α und EGF. Außerdem induziert der Antikörper die Dimerisierung und die Herunterregulation von EGFR. Der ErbB2 spezifische Antikörper Pertuzumab verhindert durch Bindung an ErbB2 die Bildung von ErbB2-Heterodimeren. Pertuzumab verhindert z. B. die Bildung NRG induzierter ErbB2/ErbB3 Heterodimere. Der ErbB2 spezifische monoklonale Antikörper Trastuzumab (Herceptin) bewirkt durch Induktion der Rezeptorinternalisierung die Herunterregulation von ErbB2. Die Rekrutierung von Immuneffektorzellen durch Herceptin stellt einen weiteren Wirkmechanismus des Antikörpers dar. Immuntoxine sind Fusionsproteine, die ein Antikörperfragment und eine cytotoxische Domäne auf einer Polypeptidkette vereinen. Das ErbB2 spezifische Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA besteht aus einem ErbB2 spezifischen „single-chain“ Antikörper (scFv), der mit einer verkürzten Form des bakteriellen Exotoxin A fusioniert ist. Durch Bindung von scFv(FRP5)-ETA an ErbB2, Internalisierung durch rezeptorvermittelte Endocytose und intrazelluläre Translokation des Immuntoxins in das Cytosol gelangt das bakterielle Exotoxin A an seinen Wirkort. Im Cytosol führt die durch Exotoxin A katalysierte ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2 zu dessen Inaktivierung und so zur Inhibition der Proteinbiosynthese.

Zur Vermittlung mitogener Signale dimerisiert ErbB2 mit anderen, ligandenaktivierten Rezeptoren. Diese Heterodimerisierung wird durch den monoklonalen ErbB2 spezifischen humanisierten Antikörper Pertuzumab (Omnitarg, Genentech, San Francisco, CA, USA; Hoffman La-Roche, Basel, CH) inhibiert. Der Antikörper wird derzeit in verschiedenen klinischen Studien auf seine Eignung für einen therapeutischen Einsatz untersucht [Übersicht in: (Spicer, 2004)]. Generell stellt das Verhindern der Rezeptordimerisierung durch sog. „Her dimerization inhibitors“ (HDIs) neben dem Einsatz von Herceptin und Tyrosinkinaseinhibitoren einen neuen und vielversprechenden Ansatz dar (Groner *et al.*, 2004).

Die Wirksamkeit monoklonaler Antikörper kann verbessert werden, indem sie chemisch oder gentechnisch an toxische oder immunstimulatorische Moleküle gekoppelt werden. Für daraus resultierende Antikörper-Konjugate bzw. Fusionsproteine konnte gezeigt werden, daß sie eine größere antitumorale Aktivität besitzen als die parentalen mAbs (Wels *et al.*, 1992). „Single chain“ Antikörperfragmente bestehen aus den variablen Bereichen der leichten und der schweren Kette eines mAb, die über einen Peptidlinker miteinander verknüpft sind. Rekombinante Immuntoxine repräsentieren eine Klasse von Antikörperfusionsproteinen, die mit Hilfe ihrer Zellerkennungsdomäne (scFv) spezifisch tumorassoziierte Antigene erkennen können. Diese Zellbindungsdomänen sind durch Genfusion mit einer cytotoxisch wirkenden Domäne (Effektordomäne) verknüpft. Als Effektordomänen werden v. a. bakterielle (*Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A, *Corynebacterium diphtheriae* Diphtherietoxin) und pflanzliche (*Ricinus alba* Ricin, *Gelonium multiflorum* Gelonin, *Phytolacca americana* „Pokeweed antiviral protein“) Toxine verwendet (Frankel *et al.*, 2000; Pastan, 2003). Die pflanzlichen Toxine sind N-Glycosidasen, die durch Spaltung der ribosomalen RNA zur Inaktivierung der Ribosomen führen. Die bakteriellen Toxine Exotoxin A und Diphtherietoxin hingegen katalysieren die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2, der dadurch inaktiviert wird. Das Resultat ist in beiden Fällen die Blockade der Proteinbiosynthese, was zur Induktion von Apoptose führt (Thorburn *et al.*, 2004). Verschiedene Immuntoxine, die unterschiedliche Tumorantigene erkennen, wurden in den letzten Jahren in klinischen Studien untersucht und zeigten z. T. deutliche antitumorale Wirkung [Übersicht: (Frankel *et al.*, 2000; Kreitman, 2003; Pastan, 2003)]. Hierzu gehört auch das rekombinante Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA, das aus einem ErbB2 spezifischen scFv Antikörperfragment und verkürztem Exotoxin A aufgebaut ist. ScFv(FRP5)-ETA zeigte *in vitro* und *in vivo* hohe cytotoxische Aktivität gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen (Maurer-Gebhard *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1997; Wels *et al.*, 1995) und wird derzeit in einer klinischen Studie der Phase I auf seine Eignung für einen therapeutischen Einsatz untersucht (Azemar *et al.*, 2003; Maurer-Gebhard *et al.*, 1998; Wels *et al.*, 1992).

Ein generelles Problem solcher Moleküle für den therapeutischen Einsatz besteht jedoch darin, daß die Toxindomäne bakteriellen Ursprungs und damit im menschlichen Organismus immunogen ist. Trotz Therapie-Erfolgen sind Immuntoxine daher nur zeitlich begrenzt einsetzbar, da neutralisierende Antikörper gebildet werden (Azemar *et al.*, 2003; Hall *et al.*, 2001; Kreitman *et al.*, 2000). Als Nebenwirkung wurde darüber hinaus v. a. bei Toxinen, die von Exotoxin A abgeleitet sind, Lebertoxizität beobachtet (Azemar *et al.*, 2003; Onda *et al.*, 2000; Pai-Scherf *et al.*, 1999).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Die Behandlung von Tumorerkrankungen, insbesondere im metastasierenden Stadium, stellt eine besondere Herausforderung hinsichtlich einer effizienten Therapie dar. Es ist eine systemische Behandlung des Patienten erforderlich, um Metastasen zu eliminieren, wobei jedoch die Schädigung von gesundem Gewebe vermieden werden muß. Dies wird dadurch erschwert, daß in Tumorzellen vielfach Mechanismen aktiv sind, die dazu führen, daß die Induktion von apoptotischem Zelltod blockiert wird. Sowohl das Auftreten von Resistenzen als auch die z. T. erheblichen Nebenwirkungen beschränken den Erfolg klassischer Chemotherapie.

Das selektive Einschleusen proapoptotischer Signalmoleküle in Tumorzellen durch Antikörperfusionsproteine könnte eine neuartige Strategie darstellen, diese entarteten Zellen durch Induktion von Apoptose zu eliminieren. Caspasen sind die Moleküle, die am unteren Ende apoptotischer Signalkaskaden aktiviert werden und damit die eigentlichen Effektoren des apoptotischen Zelltods. Das gezielte Einschleusen von Enzymen in Tumorzellen, die Effektorcaspase-3 direkt aktivieren, stellte einen besonders vielversprechenden Ansatz zur Induktion von Apoptose dar, unabhängig von den verschiedenen Mechanismen, die apoptotische Signalwege in Tumorzellen blockieren. Die Serinprotease Granzym B (GrB) aus cytotoxischen Lymphocyten aktiviert Caspase-3 (Andrade *et al.*, 2004) und sollte daher gut geeignet sein für die Verwendung als Effektorfunktion in „humanisierten“, Immuntoxin-ähnlichen Fusionsproteinen. GrB ist neben Caspasen das einzige Enzym, das Caspase-3 direkt aktiviert, kann jedoch auch unabhängig von Caspasen Apoptose induzieren, indem es direkt Caspasen-Substrate wie ICAD oder Bid spaltet (vgl. Abschnitt 1.4.2). GrB greift damit offenbar an verschiedenen Punkten in apoptotische Signalwege ein, die alle unmittelbar die Initiierung des apoptotischen Zelltods bewirken (Andrade *et al.*, 2004).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, GrB durch Kopplung oder Fusion mit Zellbindungsdomänen mit Spezifität für Tumorzellen auszustatten und zu untersuchen, ob die Protease in Antikörperfusionsproteinen zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen eingesetzt werden kann. Als Zellbindungsdomänen wurde das ErbB2-spezifische „single-chain“ Antikörperfragment scFv(FRP5) und der hochaffine Ligand des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) TGF α eingesetzt. Neben GrB wurde zusätzlich das Flavoprotein „apoptosis inducing factor“ (AIF) als Effektor in apoptose-induzierenden Antikörperfusionsproteinen untersucht. AIF induziert nach gegenwärtigem Kenntnisstand Apoptose unabhängig von Caspasen (Cande *et al.*, 2004).

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Chromatographiemedien, Verbrauchsmaterialien, Reagenzien

Chemikalien	Sigma (Deisenhofen), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Neu-Ulm), Serva (Heidelberg), Peqlab (Erlangen), Roche (Mannheim)
Komponenten bakterieller Wachstumsmedien oder Hefewachstumsmedien	Becton Dickinson (Heidelberg), Roth, Fluka
Molekulargewichtsmarker (Benchmark, MIV)	Invitrogen (Karlsruhe), Peqlab
DNA-Längenstandard 1 kb DNA ladder	Invitrogen
Chelating Sepharose FastFlow	Amersham (Freiburg)
Ni-NTA-Fastflow chelatisierende Sepharose	Qiagen (Hilden)
Plastikwaren und Filtersysteme für das Labor und die Zellkultur	Costar (Bodenheim), Greiner (Frickenhausen), Schleicher & Schuell (Dassel), Becton Dickinson oder Nalgene (Rochester, NY, USA), Millipore (Eschborn)
Dialyseschläuche	Roth, Invitrogen
Immobilon-P Transfer Membran	Millipore
Whatman 3MM Filterpapier	Whatman (London, GB)
Zellkulturmedien, Glutamin, Trypsin/EDTA-Lösung, Antibiotika und fötales Kälberserum für die Zellkultur	Serva (Heidelberg), Cambrex (Verviers, Belgien)
Sulfo-NHS-Biotin	Pierce (Rockford, IL, USA)
ECL Chemolumineszenz kit	Amersham
Peptidsubstrate und -inhibitoren für Granzym B und Caspase-3	Alexis
Streptavidin, rekombinant, gereinigt	New England Biolabs (Schwalbach)
Restriktionsenzyme, DNA-modifizierende Enzyme, DNA-Polymerasen und zugehörige Puffer	New England Biolabs, Roche, Fermentas (St. Leon-Rot), Roth, Invitrogen
Desoxynukleotid-Triphosphate	Roche, Peqlab

2.1.2 Antikörper und Nachweisreagenzien

Antikörper

Antigen	Markierung	Spezies	Klon oder Name	Hersteller oder Referenz
ErbB2	-	Maus	FRP5	(Harwerth <i>et al.</i> , 1992)
Myc-tag	-	Maus	9E10	(Evan <i>et al.</i> , 1985)
FLAG-tag	-	Maus	M2 anti-FLAG	Sigma
SWA11-Epitop	-	Maus	SWA11	(Smith <i>et al.</i> , 1989)
Streptavidin	-	Kaninchen	polyklonal	Sigma
Granzym B	-	Maus	2C5	Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)
Caspase-3	-	Maus	E-8	Santa Cruz
AIF	-	Ziege	polyklonal	Santa Cruz
MBP	-	Maus	MBP-17	Sigma
GST	-	Ziege	polyklonal	Beckton Dickinson
Maus IgG	HRP	Ziege	polyklonal	Sigma
Maus IgG	HRP	Schaf	polyklonal	Amersham
Kaninchen IgG	HRP	Ziege	polyklonal	Sigma
Maus IgG	Alexa488	Ziege	polyklonal	Invitrogen
Maus IgG	PE	Ziege	polyklonal	Dianova
Maus IgG	FITC	Ziege	polyklonal	Beckton Dickinson

Nachweisreagenzien

Detektion von	Markierung	Nachweisreagenz	Hersteller
Streptavidin	AP	Biotin-AP Konjugat	Promega (Madison, WI, USA)
Biotin	AP	Streptavidin-AP Konjugat	NEB

2.1.3 Puffer

Name	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,4 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
TBS	10 mM Tris pH 7,5; 150 mM NaCl
TTBS	TBS + 0,05 % Tween 20 (v/v) (Fluka)

Alle anderen in dieser Arbeit verwendeten Puffer sind an entsprechender Stelle angegeben.

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Verwendung	Hersteller oder Referenz
pBluescript II KS (pBIIKS)	Kloniervektor	Stratagene
pBIIKS-MH	[<u>MH</u>] enthält die Sequenzen, die für den Myc-tag und den His-tag kodieren	(Gerstmayer, 1997)
pFLAG-1	[<u>ompA-FLAG</u>] Bakterieller Expressionsvektor, der für das Periplasma-Sekretionssignal <i>ompA</i> und den FLAG-tag kodiert.	Kodak International Biotechnologies Inc.
pSW50	[<u>ompA-FLAG-H</u>] pFLAG basierender Vektor, der die Sequenz kodierend für den His-tag vor der „multiple cloning site“ enthält	(Gerstmayer, 1997)
pSW5	[<u>MH</u>] pFLAG basierender Vektor, der für einen Myc-tag und einen His-tag hinter der „multiple cloning site“ kodiert	(Rohrbach <i>et al.</i> , 2000)
pGEX-4T1	[<u>GST</u>] Vektor zur Expression von GST-Fusionsproteinen in <i>E. coli</i> .	Amersham
pMAL-NN-EGFP	[<u>MBP-EGFP</u>] Vektor zur Expression von EGFP als N-terminales MBP Fusionsprotein in <i>E. coli</i> .	(Bach <i>et al.</i> , 2001)
pWW152-scFv(FRP5)	[<u>scFv(FRP5)</u>] pBluescript basierendes Plasmid, das die Sequenz des scFv(FRP5) enthält	(Wels <i>et al.</i> , 1995)
pWW152-GSH-scFv(FRP5)	[<u>GSH-scFv(FRP5)</u>] pBluescript basierendes Plasmid, das die Sequenz des Linkers GSH und des scFv(FRP5) enthält	diese Arbeit
pWW152-TGF α	[<u>TGFα</u>] pBluescript basierendes Plasmid, das die Sequenz von TGF α enthält	(Schmidt <i>et al.</i> , 1999)
pWW152-GSH-TGF α	[<u>GSH-TGFα</u>] pBluescript basierendes Plasmid, das die Sequenz des Linkers GSH und von TGF α enthält	diese Arbeit
pBIIKS-GrB	[<u>GrB₁₋₂₄₇</u>] enthält die cDNA von humanem Granzym B	(Giesübel, 2003)
pPIC9	[<u>α</u>] Vektor zur Expression von Proteinen in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> und Sekretion in das Kulturmedium; enthält das α -Faktor Sekretionssignal von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Invitrogen

Plasmid	Verwendung	Hersteller oder Referenz
pPIC9-GrB	[α -GrB ₂₁₋₂₄₇ -MH] Vektor zur Expression von enzymatisch aktivem reifem Granzym B als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	(Giesübel, 2003)
pPIC9-GrB _{S183A}	[α -GrB _{S183A, 21-247} -MH] Vektor zur Expression von enzymatisch inaktivem reifem Granzym B als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> ; enthält die Punktmutation Ser ₁₈₃ Ala	(Giesübel, 2003)
pPIC9-GrB-scFv(FRP5)	[α -GrB ₂₁₋₂₄₇ -GSH-scFv(FRP5)-MH] Vektor zur Expression von GrB-5 als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	diese Arbeit
pPIC9-GrB _{S183A} -scFv(FRP5)	[α -GrB _{21-247, S183A} -GSH-scFv(FRP5)-MH] Vektor zur Expression von GrB _{S183A} -5 als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> ; enthält die Punktmutation Ser ₁₈₃ Ala	diese Arbeit
pPIC9-GrB-TGF α	[α -GrB ₂₁₋₂₄₇ -GSH-TGF α -MH] Vektor zur Expression von GrB-T als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	diese Arbeit
pPIC9-GrB _{S183A} -TGF α	[α -GrB _{21-247, S183A} -GSH-TGF α -MH] Vektor zur Expression von GrB _{S183A} -T als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i> ; enthält die Punktmutation Ser ₁₈₃ Ala	diese Arbeit
pBIIKS-SA	[SA]) enthält die Sequenz von core-Streptavidin	(Rohrbach, unveröffentlicht)
pSW5-SA	[SA-MH] bakterielles Expressionsplasmid, das die Sequenzen von core-Streptavidin gefolgt von dem Myc-tag und einem His-tag enthält	(Rohrbach, unveröffentlicht)
pSW5-SA-scFv(FRP5)	[SA-MH-scFv(FRP5)-MH] Vektor zur Expression von SA-5 in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pSW202	[ompA-FLAG-H-ETA42] Vektor zur Expression von verkürztem <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Exotoxin A (Aminosäuren 252-613) in <i>E. coli</i>	(Zimmermann <i>et al.</i> , 1997)
pSW5-EGFP	[EGFP-MH] Vektor zur Expression des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) gefolgt von dem Myc-tag und einem His-tag in <i>E. coli</i>	(Rohrbach, unveröffentlicht)
pBIIKS-AIF	[AIF] enthält die cDNA des humanen „apoptosis inducing factor“ (AIF)	diese Arbeit
pBIIKS-AIF _{Δ1-100}	[AIF _{Δ1-100}] enthält die Sequenz der Deletionsmutante AIF _{Δ1-100}	diese Arbeit

Plasmid	Verwendung	Hersteller oder Referenz
pBIIKS-AIF _{Δ1-120}	[<u>AIF_{Δ1-120}</u>] enthält die Sequenz der Deletionsmutante AIF _{Δ1-120}	diese Arbeit
pJF50-5X	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-E2C</u>] Vektor zur Expression eines scFv(FRP5)-E2C Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	(Sloots, 2004)
pJF50-5EX	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-ETAIL-E2C</u>] Vektor zur Expression eines scFv(FRP5)-ETAIL-E2C Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	(Sloots, 2004)
pJF50-scFv(FRP5)-AIF _{Δ1-100}	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-AIF_{Δ1-100}</u>] Vektor zur Expression von 5-AIF in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pJF50-scFv(FRP5)-AIF _{Δ1-120}	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-AIF_{Δ1-120}</u>] Vektor zur Expression eines scFv(FRP5)-AIF _{Δ1-120} Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pJF50-scFv(FRP5)-ETAIL-AIF _{Δ1-100}	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-ETAIL-AIF_{Δ1-100}</u>] Vektor zur Expression von 5-E-AIF in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pJF50-scFv(FRP5)-ETAIL-AIF _{Δ1-120}	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-ETAIL-AIF_{Δ1-120}</u>] Vektor zur Expression eines scFv(FRP5)-ETAIL-AIF _{Δ1-120} Fusionsproteins in <i>E. coli</i>	diese Arbeit
pJF50-scFv(FRP5)-ETAIL-AIF _{Δ1-100, R192A, K194A}	[<u>ompA-FLAG-H-scFv(FRP5)-ETAIL-AIF_{Δ1-100, R192A, K194A}</u>] Vektor zur Expression von 5-E-AIF _{R192A/K194A} in <i>E. coli</i> ; enthält die beiden Punktmutationen Arg ₁₉₂ Ala, Lys ₁₉₄ Ala	diese Arbeit
pBIIKS-fur-GrB	[<u>fur-GrB₂₁₋₂₄₇</u>] kodiert für eine Furin Erkennungssequenz und für reifes Granzym B	diese Arbeit
pBIIKS-furS-GrB	[<u>furS-GrB₂₁₋₂₄₇</u>] kodiert für eine Furin Erkennungssequenz und für reifes Granzym B	diese Arbeit
pBIIKS-MBP-furS	[<u>MBP-furS</u>] kodiert für <i>Escherichia coli</i> „maltose binding protein“ (MBP) gefolgt von einer Furin Erkennungssequenz	diese Arbeit
pBIIKS-GST-furS	[<u>GST-furS</u>] kodiert für <i>Schistosoma japonicum</i> Glutathion S-transferase (GST) gefolgt von einer Furin Erkennungssequenz	diese Arbeit
pSW5-ErbB2 ₁₋₂₂₂	[<u>ErbB2₁₋₂₂₂-MH</u>] Vektor zur Expression von ErbB2 ₁₋₂₂₂ in <i>E. coli</i>	(Rohrbach <i>et al.</i> , 2005)
pPIC9-MBP-fur-GrB	[<u>α-MBP-fur-GrB₂₁₋₂₄₇-MH</u>] Vektor zur Expression von MBP-fur-GrB als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	diese Arbeit

Plasmid	Verwendung	Hersteller oder Referenz
pPIC9-MBP-furS-GrB	[<u>α-MBP-furS-GrB₂₁₋₂₄₇-MH</u>] Vektor zur Expression von MBP-furS-GrB als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	diese Arbeit
pPIC9-GST-furS-GrB	[<u>α-GST-furS-GrB₂₁₋₂₄₇-MH</u>] Vektor zur Expression von GST-furS-GrB als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	diese Arbeit
pPIC9-ErbB2 ₁₋₂₂₂	[<u>α-ErbB2₁₋₂₂₂-SH</u>] Vektor zur Expression von ErbB2 ₁₋₂₂₂ als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	(Gerstmayer, 1997)
pPIC9-MBP-furS-ErbB2 ₁₋₂₂₂	[<u>α-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂-MH</u>] Vektor zur Expression von MBP-furS-ErbB2 ₁₋₂₂₂ als sekretiertes Protein in der Hefe <i>Pichia pastoris</i>	diese Arbeit
pCR2.1-GAPDH	[<u>GAPDH</u>] enthält die Sequenz der Glyceral-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) von <i>Pichia pastoris</i> (Nukleotide 3-962)	diese Arbeit

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von den Firmen BioSpring (Frankfurt) und MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Oligonukleotide, die für den (Gly₄-Ser)₄-His₆ Linker (GSH) kodieren:

GSH-sense 5'-CCATCGATGGCGGTGGCGGATCCGGTGGCGGTGGCTCCGGCGG-TGGCGGTTCTGGTGGCGGCGGTTCTCACCATCATCACCATCACAA-GCTTGGGG-3'

GSH-antisense 5'-CCCCAAGCTTGTGATGGTGATGATGGTGAGAACCGCCGCCACC-AGAACCGCCACCGCCGGAGCCACCGCCACCGGATCCGCCACCGC-CATCGATGG-3'

Primer zur Insertion der Punktmutation Ser₁₈₃Ala in Granzym B Fusionskonstrukte zur Generierung der inaktiven Enzymmutanten:

GrB S183A-sense 5'-CCTTTAAGGGGGACGCTGGAGGCCCTCTTG-3'

GrB S183A-antisense 5'-CAAGAGGGCCTCCAGCGTCCCCCTTAAAGG-3'

Primer zur Amplifikation der Sequenzen, die für MBP, GST, MBP-furS bzw. GST-furS kodieren. Die 5' Primer fügen eine *Hind*III bzw. *Nde*I Schnittstelle ein. Die 3' Primer führen entweder *Sal*I und *Xho*I Schnittstellen zusammen mit der Sequenz, die für furS kodiert, oder *Xba*I Schnittstellen ein.

5'<i>Hind</i>III-MBP	5'-AAGCTTATGAAAACCTGAAGAAGGTAAACTGG-3'
5'<i>Hind</i>-GST	5'-AAGCTTATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATTAAG-3'
5'<i>Nde</i>I-GST	5'-AAAAAAACATATGATGTCCCCTATACTAGGTTATTGGAAAATT- AAG-3'
5'<i>Nde</i>I-MBP	5'-AAAAAAACATATGATGAAAACCTGAAGAAGGTAAACTGG-3'
3'<i>Xho</i>I-<i>Sal</i>I-furS-MBP	5'-TTTTTCTCGAGTTTTTGTGCGACGCTACGTTTGTAAGAGCACGGC- TCGAATTAGTCTGCGCGTCTTTCAGGGC-3'
3'<i>Xho</i>I-<i>Sal</i>I-furS-GST	5'-TTTTTCTCGAGTTTTTGTGCGACGCTACGTTTGTAACGAGCACGA- TCCGATTTTGGAGGATGGTCGCCACCACCA-3'
3'<i>Xba</i>I-GST	5'-AAATCTAGAGCATCCGATTTTGGAGGATGGTCGCCACCACCAA- ACGTG-3'
3'<i>Xba</i>I-MBP	5'-AAATCTAGAGCCGAGCTCGAATTAGTCTGCGCGTC-3'

Primer zur Amplifikation der GAPDH aus *Pichia pastoris*:

5'<i>GAPDH-Pichia</i>	5'-GGCTATCACTGTCCGTATTAACGG-3'
3'<i>GAPDH-Pichia</i>	5'-GTGGAGTAACCGTACTCGTTGTCG-3'

Primer und Sonden zur Amplifikation bzw. Detektion von GrB mRNA und GAPDH mRNA in quantitativen PCR-Analysen:

Taq-GrB+	5'-TGGAGGCCCTCTTGTGTGTAA-3'
Taq-GrB-	5'-GCATGCCATTGTTTCGTCC-3'
Taq-GAPDH+	5'-GTCAACGACACTTTCGGAATTG-3'
Taq-GAPDH-	5'-TTGAGTGGCGGTCATGGA-3'
GrB-So	5'-AAGGTGGCCCAGGGCATTGTCTC-3' (5'-Modifikation: FAM, 3'Modifikation: TAMRA)
GAPDH-So	5'-TCCGGTTTGATGACCACCGTCCA-3' (5'-Modifikation: FAM, 3'Modifikation: TAMRA)

Primer zur Amplifikation von AIF, AIF_{Δ1-100} und AIF_{Δ1-120}. Die 5' Primer fügen eine *Sal*I Schnittstelle zur Klonierung des vollständigen AIF ein, bzw. *Kpn*I Schnittstellen zur Klonierung der AIF Deletionsmutanten. Der 3' Primer fügt eine *Eco*RI Schnittstelle ein.

5'<i>Sal</i>I-AIF	5'-AAAAGTCGACATGTTCCGGTGTGGAGGCCTGGCGGCGGGTGCT- TTG-3'
3'<i>Eco</i>RI-AIF	5'-AAGAATTCTCAGTCTTCATGAATGTTGAATAGTTTGGCTACTTC-3'

5'*KpnI*-AIF_{Δ1-100} 5'-AAAGGTACCGGGTTAGGGCTGACACCAGAACAGAAACAGAA-
AAAGG-3'

5'*KpnI*-AIF_{Δ1-120} 5'-AAAGGTACCGAGGAAGTTCCTCAAGACAAGGCGCCAAGTCATG-
TTC-3'

Mutagenese-Primer zur Generierung der Sequenz, die für die AIF-Mutante (Arg₁₉₂Ala, Lys₁₉₄Ala) kodiert:

AIF-R192A/K194A-sense

5'-GACCCAAATGTCACAAAGACACTGGCTTTCGCTCAGTGGAATGG-3'

AIF-R192A/K194A-antisense

5'-CCATTCCACTGAGCGAAAGCCAGTGTCTTTGTGACATTTGGGTC-3'

Primer zum Einfügen der Sequenzen, die für die Furin Erkennungssequenzen fur und furS kodieren. Mit den Primern 5'*XbaI*-furS-GrB bzw. 5'*XbaI*-fur-GrB und 3'*XhoI*-STOP-His wurden die Sequenz von reifem Granzym B amplifiziert. Die Primer fügten am 5' Ende Sequenzen kodierend für Furin Schnittstellen sowie *XbaI* und *XhoI* (3' Ende) Restriktionsschnittstellen ein.

5'*XbaI*-furS-GrB 5'-ATATCTAGAACGTGCTCGTTACAAACGTAGCATC-3'

5'*XbaI*-fur-GrB 5'-ATATCTAGAACGTGCTCGTTACAAACGTATCATCGG-3'

3'*XhoI*-STOP-His 5'-TTTGATCTCGAGTCAGTGATGGTGATGATGGTG-3'

Standardprimer zur Sequenzierung von Plasmiden, die die Sequenz des N-terminalen Fragments der β -Galactosidase enthalten:

M13 forward 5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'

M13 reverse 5'-AACAGCTATGACCATG-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung der klonierten AIF cDNA:

AIFint-seq+ 5'-CGTACATGCGACCTCCTCTT-3'

AIFint-seq- 5'-CCTGCCACCCAGATGTTAGA-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung von Plasmiden mit pMAL Rückgrat:

pMAL-seq+ 5'-GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC-3'

pMAL-seq- 5'-CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung von Plasmiden mit pPIC9 Rückgrat:

AOX-seq+ 5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'

AOX-seq- 5'-GACTGGTTCCAATTGACAAGC-3'

Oligonukleotide zur Sequenzierung von Plasmiden mit pSTE2 Rückgrat:

pSTE2-seq+ 5'-GAGCGGATAACAATTTTCACAC-3'
 pSTE2-seq- 5'-GTGATGATGGGATAGATCTTC-3'

2.1.6 Mikroorganismen und Kulturbedingungen

Escherichia coli

Stamm	Genotyp	Referenz
BL21-CodonPlus(DE3)-RIL	<i>E. coli</i> , B F ⁻ <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (r _B ⁻ m _B ⁻), dcm ⁺ , Tet ^r , <i>gal</i> λ(DE3), <i>endA</i> , Hte [<i>argU ileY leuW</i> Cam ^r]	Stratagene
BL21(λDE3) <i>trxB</i> ⁻	F ⁻ , <i>ompT</i> ⁻ , rB ⁻ mB ⁻ , (limm21, <i>lacI</i> , <i>lacUV5</i> , T7 pol, int ⁻) <i>trxB</i> ⁻	(Proba <i>et al.</i> , 1995)
Rosetta-gami(DE3)	Δara-leu7697 Δ <i>lacX74</i> Δ <i>phoAPvuII</i> <i>phoR</i> <i>araD139</i> <i>galE</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> F ⁺ [<i>lac</i> ⁺ (<i>lacI</i> ^q) <i>pro</i>] <i>gor522::Tn 10</i> (Tc ^R) <i>trxB::kan</i> (DE3) <i>argU</i> <i>araW</i> <i>ileX</i> <i>glyT</i> <i>leuW</i> <i>proL</i> <i>metT</i> <i>thrT</i> <i>tyrU</i> <i>thrU</i> (Cm ^R)	Novagen
XL1-blue	<i>supE44</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , F ⁺ (<i>traD36</i> , <i>proAB</i> ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> ΔM15)	(Hanahan, 1983)

Pichia pastoris

Stamm	Genotyp	Referenz
GS115	<i>his4</i>	(Sreekrishna <i>et al.</i> , 1989)
SMD1168	<i>his4</i> , <i>pep4</i>	(Cregg <i>et al.</i> , 1993)

Zelllinien

Die verwendeten Säugerzelllinien wurden im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert, mindestens einmal wöchentlich mit frischem Medium versorgt und nach Bedarf abgelöst und verdünnt neu ausgesät. Allen Medien wurden 10 % hitzeinaktiviertes fötales Kälberserum (FCS), 2 mM L-Glutamin 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin zugegeben. Die Langzeitaufbewahrung der Zelllinien erfolgte bei –80 °C oder in flüssigem Stickstoff in einem Medium aus FCS mit 10 % DMSO.

Zelllinie	Medium	FCS	L-Gln	Penicillin/ Streptomycin	G418	Zeocin	Referenz /ATCC-Nr.
A-431 humanes Vulva- karzinom	DMEM	10 %	2 mM	100 U/ml/ 100 µg/ml			CRL-1555
MDA-MB 453 humanes Mamma- karzinom	DMEM	10 %	2 mM	100 U/ml/ 100 µg/ml			HTB-131
MDA-MB 468 humanes Mamma- karzinom	DMEM	10 %	2 mM	100 U/ml/ 100 µg/ml			HTB-132
HeLa humanes Cervix- karzinom	DMEM	10 %		100 U/ml/ 100 µg/ml			CCL-2
Renca-lacZ murines Nieren- karzinom	RPMI 1640	10 %	2 mM	100 U/ml/ 100 µg/ml		0,2 mg/ml	(Maurer-Gebhard <i>et al.</i> , 1998)
Renca-lacZ/ErbB2	RPMI 1640	10 %	2 mM	100 U/ml/ 100 µg/ml	0,5 mg/ml	0,2 mg/ml	(Maurer-Gebhard <i>et al.</i> , 1998)

2.2 Methoden

Molekularbiologische Methoden wurden wie in Sambrook *et al.*, 1989 (Sambrook *et al.*, 1989) beschrieben durchgeführt. Alle aufgeführten Lösungen wurden in Reinstwasser angesetzt.

2.2.1 Amplifizierung von Plasmid-DNA in *E. coli*

Kultivierung und Stammhaltung von Bakterien

LB-Medium: 5 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton, ad 1000 ml H₂O

Glycerin: 87 %

Ampicillin: 100 mg/ml in H₂O

Alle Arbeiten mit Bakterien wurden mit autoklaviertem Material unter sterilen Bedingungen durchgeführt. *E. coli* Zellen wurden in LB-Glycerinkulturen bei -80 °C gelagert. Dazu wurde ein Volumenteil einer exponentiell wachsenden LB-Flüssigkultur mit einem Volumenteil 87 %igen Glycerin versetzt. Bakterienkulturen wurde in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C in einem Schüttler (250 Upm) über Nacht inkubiert.

Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Lösung I: 150 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 30 mM CoAc; 10 mM CaCl₂;
13 % Glycerin; pH 5,8; sterilfiltriert

Lösung II: 10 mM MOPS; 10 mM RbCl; 75 mM CaCl₂; 13 % Glycerin; pH 7,0;
sterilfiltriert

500 ml Bakterienkultur wurden in LB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,5 herangezogen und bei 4 °C für 10 min bei 2200 Upm in einem JA-10 Rotor (Beckmann) abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 170 ml eiskalter Lösung I resuspendiert und 1-2 h auf Eis inkubiert. Durch erneute Zentrifugation wurden die Bakterien pelletiert und in 12,5 ml eiskalter Lösung II resuspendiert. Aliquote der kompetenten Bakterien wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

LB_{Amp} Agar Platten: 5 g NaCl; 5 g Hefeextrakt; 10 g Trypton; H₂O ad 1000 ml;
1,5 % (w/v) Agar; 100 µg/ml Ampicillin

Kompetente *E. coli* wurden auf Eis aufgetaut. 100 µl Bakteriensuspension wurden mit 50-100 ng Plasmid-DNA bzw. der Hälfte eines Ligationsansatzes vermischt und für 20 min auf Eis gestellt. Die Bakterien wurden für 2 min (XL1-blue und Rosetta-gami) bzw. 45 sek (BL21) im Wasserbad bei 42 °C inkubiert und sofort auf Eis gestellt. Transformierte Bakterien wurden auf LB_{Amp}-Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Durch das zugesetzte Ampicillin wurden Plasmid enthaltende Bakterien selektioniert und mittels Plasmidisolierung (siehe 2.2.2) und Restriktionsverdau (siehe 2.2.6) überprüft.

2.2.2 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Zur Isolierung und Reinigung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) gemäß den Anleitungen des Herstellers verwendet. Dabei wurde zur analytischen DNA-Isolierung der Qiaprep spin- („Miniprep“) und zur präparativen DNA-Isolierung der Plasmid Midi- („Midiprep“) bzw. Maxi-Kit („Maxiprep“) benutzt.

2.2.3 Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA

Die Bestimmung von DNA- bzw. RNA-Konzentrationen erfolgte durch Messung der Extinktionen verdünnter Nukleinsäurelösungen bei 260 nm in 1 cm Quarzküvetten. Dabei wurde davon ausgegangen, daß eine OD₂₆₀=1 einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml einzelsträngiger RNA entspricht.

2.2.4 Isolierung von RNA, Synthese und Amplifikation von cDNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA aus Makrophagen wurde mit dem „RNeasy total RNA purification kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers durchgeführt.

Die RT-PCR zur Amplifikation der cDNA wurde mit spezifischen Primern unter Verwendung des „One step RT-PCR kit“ der Firma Qiagen nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Als „template“ wurden etwa 0,5 µg RNA eingesetzt.

Zur Isolierung von RNA aus der Hefe *Pichia pastoris* wurden Expressionskulturen verwendet, die 24 h mit 2 % MeOH in BMMY (pH=8) induziert wurden und anschließend mit BMMY auf OD₆₀₀=8 eingestellt wurden. Aus diesen Kulturen wurden 1 ml Proben entnommen und diese bei 3000 g für 5 min zentrifugiert. Zur Herstellung von Hefe-Sphäroblasten wurden die Zellpellets in 100 µl Lyticase-Puffer mit 50 U Lyticase (Sigma) resuspendiert und für 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Überstand wurde durch Zentrifugieren für 5 min bei 300 g abgetrennt und die RNA der Hefe-Sphäroblasten wurde mit dem „RNeasy total RNA purification kit“ der Firma Qiagen nach Anweisung des Herstellers isoliert. Die Qualität und Konzentration der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese und Extinktionsmessung bei 260 nm und 280 nm bestimmt.

Die Amplifikation der Glyceral-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) cDNA aus *Pichia pastoris* erfolgte durch RT-PCR mit den spezifischen Primern 5'GAPDH-*Pichia* und 3'GAPDH-*Pichia* unter Verwendung des „One step RT-PCR kit“. Die Reaktionen enthielten 2 µg RNA aus *Pichia pastoris* als „template“ und je 0,6 µM der jeweiligen Oligonukleotidprimer und wurden bei folgenden Temperaturen durchgeführt: 30 min bei 50 °C, 15 min bei 95 °C, 35 Zyklen (45 sek bei 94 °C, 45 sek bei 56 °C, 1 min bei 72 °C), 10 min bei 72 °C. Die Reaktionen wurden im Agarosegel elektrophoretisch getrennt, das Amplifikat ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert. Durch „TA-cloning“ wurde das GAPDH-Fragment in das linearisierte Plasmid pCR2.1 (Invitrogen) eingesetzt. Das resultierende Plasmid pCR2.1-GAPDH wurde in TaqMan PCR Analysen (vgl. 2.2.5) als Standard eingesetzt.

Die cDNA für quantitative PCR Analysen wurde aus jeweils 1-5 µg RNA nach einem Standardprotokoll synthetisiert (van Dongen *et al.*, 1999).

2.2.5 „Polymerase-Chain-Reaction“ (PCR) Anwendungen

Amplifikation von DNA-Fragmenten

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte in einem „Perkin Elmer 9600 Thermocycler“. Die Reaktionen wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl bestehend aus der DNA-Matrize, 1 U Vent DNA Polymerase (New England Biolabs) oder Taq DNA Polymerase (Qiagen), Vent bzw. Taq DNA Polymerasepuffer, je 2 µM Oligonukleotidprimer und je 200 µM der Desoxyribonukleotide (jeweils Endkonzentrationen) durchgeführt.

Die Polymerase wurde nach etwa 5 minütiger Denaturierung der DNA-Matrize bei 94 °C zuge-

geben. Falls nicht anders angegeben, wurde die Denaturierung bei 94 °C für 1 min, die Hybridisierung der Oligonukleotide bei der angegebenen Temperatur für 1 min und die Polymerasereaktion bei 72 °C (1 min pro kb zu amplifizierender DNA) in 30 Zyklen durchgeführt. Anschließend wurden die amplifizierten DNA-Fragmente durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Amplifikate gegebenenfalls aus dem Gel eluiert.

Mutagenese

Mutagenese von DNA-Fragmenten wurde mit Hilfe spezifischer Primer, die die gewünschte Mutation einführen, in einer PCR durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, daß die gewünschte Mutation „mismatch“ von mit der Matrize komplementären Bereichen umgeben war und das Plasmid vollständig amplifiziert wurde. Je Reaktion wurden zwei antiparallele Primer zur Amplifikation beider Stränge eines vollständigen Plasmids als „template“ verwendet.

Die PCR wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Ein Reaktionsansatz bestand aus PfuTurbo Polymerase-Puffer, etwa 0,1-1 µg Plasmid als „template“, je 125 ng/µl Oligonukleotidprimer, je 200 µM der Desoxyribonukleotide und 2,5 U/µl PfuTurbo Polymerase (Stratagene). Nach Zugabe der Polymerase zum eisgekühlten Reaktionsansatz wurde dieser für 30 sek auf 95 °C erhitzt. Die Denaturierung wurde bei 95 °C für 30 sek, die Hybridisierung der Oligonukleotide bei 55 °C für 1 min und die Polymerasereaktion für 1 min je kb der „template“-DNA bei 68 °C in 12-18 Zyklen durchgeführt. Durch Zugabe von 1 µl des Restriktionsenzym *DpnI* und Inkubation für 1 h bei 37 °C wurde die „template“-DNA abgebaut. 10 µl des so behandelten Reaktionsansatzes wurden verwendet, um *E. coli* XL1-blue zu transformieren.

Nachweis der genomischen Integration von cDNA-Konstrukten in transformierten *Pichia* Klonen

Um die Integration der rekombinanten DNA-Konstrukte in das Hefegenom nachzuweisen, wurden mehrere Klone je Transformationsansatz mittels PCR analysiert. Dazu wurden 10 ml YPD-Kulturen der einzelnen Klone über Nacht herangezogen. Jeweils 100 µl dieser Kulturen wurden durch Zugabe von je 20 µl 0,05 N NaOH-Lösung und Inkubation für 10 min lysiert und mit je 2 µl 0,5 M HCl-Lösung neutralisiert. Für die PCR wurden je 2 µl dieser aufgeschlossenen Kulturen als „template“ eingesetzt. Als Primer wurden die unter 2.1.5 aufgeführten *AOX*-seq+ und *AOX*-seq- Oligonukleotide verwendet. Die damit synthetisierten PCR-Produkte sind aufgrund der Vektor-kodierten flankierenden *aox1*-Sequenzen um 492 bp größer als die klonierten cDNA-Konstrukte. Sofern die Rekombination im *aox1*-Lokus nicht zu einem Genaustausch geführt hat, entsteht außerdem ein 2,2 kb PCR-Produkt des endogenen *aox1*-Gens. Die Hybridisierung der primer wurde bei 48-52 °C für 1 min, die Polymerasereaktion 90 sek bei 72 °C und die Denaturierung 1 min bei 95 °C in 30 Zyklen durchgeführt.

Quantitative PCR

TaqMan PCR Analysen wurden in Duplikaten in einem „Abi PRISM 7700 sequence detection system“ (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Zur Analyse der Expression von GrB mRNA wurden die Oligonukleotidprimer Taq-GrB+ und Taq-GrB- eingesetzt. Als Referenz wurde die Expression der GAPDH mit den Primern Taq-GAPDH+ und Taq-GAPDH- bestimmt. Zur Bestimmung absoluter Kopienzahlen wurden Plasmidverdünnungsreihen mit den Plasmiden pBIKS-GrB und pCR2.1-GAPDH hergestellt und diese als „template“ in den quantitativen PCR Analysen verwendet.

Ein Ansatz mit einem Gesamtvolumen von 25 μ l bestand aus 2,5 μ l cDNA (synthetisiert aus 1-5 μ g RNA; siehe Abschnitt 2.2.4) bzw. 2,5 μ l der jeweiligen Plasmidverdünnungsreihe, je 200 nM der jeweiligen Oligonukleotidprimer Taq-GrB+ und Taq-GrB- bzw. Taq-GAPDH+ und Taq-GAPDH- und 200 nM der jeweiligen Sonde GrB-So bzw. GAPDH-So (jeweils Endkonzentrationen). Desweiteren enthielten die Reaktionsansätze den „Platinum RTS qPCR-Super-Mix-UDG“ (Invitrogen) sowie den Referenzfarbstoff Rox (Invitrogen), die beide nach Herstellerangaben eingesetzt wurden.

Die Reaktionsansätze wurden durch Erwärmen auf 50 °C für 2 min aktiviert und das „template“ durch Erhitzen auf 95 °C für 10 min denaturiert. Die Amplifikation erfolgte in 45 Zyklen (15 sek bei 95 °C, 1 min bei 60 °C). Die cDNA aus einem Hefeklon, der mit dem leeren Vektor pPIC9 transformiert war, diente bei der quantitativen PCR als Kontrolle.

Mit Hilfe der Plasmidverdünnungsreihen wurden absolute Kopienzahlen der GrB bzw. GAPDH mRNA in den Proben berechnet. Zur Berechnung des relativen GrB Expressionslevels wurde der Quotient der absoluten Kopienzahl von GrB und der absoluten Kopienzahl von GAPDH bestimmt.

2.2.6 Subklonierung von DNA-Fragmenten

Restriktionsverdau von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten

Ein typischer Restriktionsansatz enthielt 1-5 μ g Plasmid DNA sowie 5-10 U des entsprechenden Restriktionsenzym in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer in einem Gesamtvolumen von 20-100 μ l. Zur Vermeidung unspezifischer Aktivität des Restriktionsenzym wurden Volumen und Enzymmenge so gewählt, daß der Restriktionsansatz nicht mehr als 5 % Glycerin enthielt. Die Inkubationszeit betrug üblicherweise 1-3 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und gegebenenfalls aus dem Gel eluiert.

Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von Vektor-DNA und DNA-Inserts wurden die einzelnen Fragmente möglichst im äquimolaren Verhältnis zueinander eingesetzt. Um die Religation von Plasmid-DNA auszuschließen, wurden die Vektoren vor der Ligation für 1 h mit 10 U Alkalischer Phosphatase (New England Biolabs)

bei 37 °C in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer inkubiert. Die Ligation erfolgte für 1 h bei 37 °C oder über Nacht bei 16 °C in einem Volumen von 20 µl mit 3 Weiss U T4-DNA-Ligase (New England Biolabs oder Roche) in dem jeweils vom Hersteller empfohlenen Puffer.

„Fill-in“ Reaktion und „mung bean“ Nuklease Verdau von DNA-Fragmenten zur Erzeugung von „blunt ends“

Zur Erzeugung von „blunt ends“ wurden nach Restriktionsverdau entstandene überhängende DNA-Enden mit dem großen Fragment der DNA-Polymerase I (Klenow) aufgefüllt oder mit „mung bean“ Nuklease verdaut. Beide Reaktionen wurden nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym in dem für den Restriktionsverdau verwendeten Puffer durchgeführt. Für die „fill-in“ Reaktion wurden 33 µM dNTPs (Endkonzentration) sowie 1 U Klenow je µg DNA zugegeben und der Ansatz 15-30 min bei 37 °C inkubiert. Zur vollständigen Abtrennung der Polymerase wurde der Ansatz vor einem weiteren Restriktionsverdau in einem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das entsprechende DNA-Fragment aus dem Gel eluiert. Der Nuklease Verdau wurde unter Zusatz von 1 mM ZnSO₄ mit 5 U „mung bean“ Nuklease für 30 min bei 30 °C durchgeführt.

Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Nach geelektrophoretischer Auftrennung auf einem präparativen Agarosegel (2.2.8) und Färbung der DNA mit Ethidiumbromid wurden die unter UV-Licht (365nm) sichtbaren DNA-Banden von Interesse ausgeschnitten. Zur Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der „Qiaquick“-Gelextraktionskit der Firma Qiagen entsprechend dem Protokoll des Herstellers verwendet.

2.2.7 Transformation von DNA-Konstrukten in *Pichia pastoris* (Elektroporation)

Die folgenden Protokolle sind im Wesentlichen dem Handbuch des „*Pichia* Expression kit“ (Invitrogen) entnommen.

YPD-Medium:	1 % Hefeextrakt (w/v); 2 % Pepton (w/v); 2 % Glucose (w/v); für Platten außerdem 2 % Agar (w/v)
MD-Platten:	1,34 % Yeast Nitrogen Base (mit (NH ₄) ₂ SO ₄ / ohne Aminosäuren) (w/v); 4x10 ⁻⁵ M Biotin; 1 % Glucose (w/v); 1,5 % Agar (w/v)
Sorbitol:	1 M in H ₂ O

Anzucht und Lagerung der Hefestämme *Pichia pastoris* GS115 und SMD1168

Die Anzucht und Lagerung erfolgte in Antibiotika-freiem YPD-Flüssigmedium bzw. auf YPD-Agar-

platten bei 30 °C. Nach der Transformation wurden die Hefen auf Histidin-freiem Minimalmedium (MD-Agar) selektioniert. YPD-Kulturen wurden zur Lagerung mit 40 % Glycerin bei -80 °C eingefroren.

Herstellung kompetenter Hefen

100 ml YPD-Medium wurden mit einer 10 ml Vorkultur so beimpft, daß die OD_{600} 0,4-0,5 betrug. Diese Kultur wurde bei einer OD_{600} von ca. 1,2-1,5 bei 1500 g für 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 40 ml eiskaltem H_2O sowie 25 ml eiskalter 1 M Sorbitol-Lösung gewaschen und schließlich in 500 μ l Sorbitol-Lösung resuspendiert. Zwischen den einzelnen Waschschritten wurden die Hefen erneut abzentrifugiert. Bis zur Transformation erfolgte die Lagerung der Hefezellen auf Eis.

Elektroporation

20 μ g Plasmid-DNA wurden zunächst mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert, zur Abtrennung des Enzyms mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol gefällt und getrocknet. Die linearisierte DNA wurde in 10 μ l TE-Puffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8) resuspendiert, mit 80 μ l Zellsuspension kompetenter Hefen in einer gekühlten 0,2 cm Elektroporationsküvette (Invitrogen) gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde mit einem „Easyject Optima“ Elektroporator der Firma Equibio bei 1800 V, 15 μ F und 335 Ω durchgeführt. Die Zellen wurden anschließend sofort in 1 ml eiskalter Sorbitol-Lösung aufgenommen. 100 μ l der Zellsuspension wurden auf histidinfreien MD-Platten ausgestrichen und bei 30 °C für 2 Tage inkubiert bis Kolonien sichtbar waren.

2.2.8 Gelelektrophoretische Methoden

Agarosegele zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

1x TAE-Puffer:	40 mM Tris; 20 mM HAc (Eisessig); 1 mM EDTA; pH 7,2
10x Probenpuffer:	40 % Saccharose (w/v); 0,25 % Bromphenolblau (w/v); 0,25 % Xylencyanol in H_2O (w/v)
Ethidiumbromid:	1 μ g/ml in H_2O

Zur Größen- und Konzentrationsbestimmung von DNA-Fragmenten dienen Agarosegele (Flachbett „Mini“-Gele; 100 mm x 75 mm x 5 mm). Die Elektrophorese erfolgte je nach gewünschtem Trennbereich in Gelen mit einem Agarosegehalt von 0,8-2,0 % (w/v) unter Zusatz von etwa 5 μ l Ethidiumbromidlösung je 100 ml Gellösung in TAE-Puffer bei einer Spannung von 80-160 V.

SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli und Färbung mit Coomassie

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung:	30 % (w/v) / 0,8 % (w/v)
Tris-HCl:	1,5 M pH 8,6
Tris-HCl:	0,5 M pH 6,8
SDS-Lösung:	10 % (w/v) in H ₂ O
APS:	(Ammoniumperoxodisulfat) 10 % (w/v) in H ₂ O
5xLaemmli-Probenpuffer:	250 mM Tris-HCl pH 6,8; 50 % Glycerin (v/v); 50 % SDS (w/v); 0,5 % Bromphenolblau (w/v); (+ 2 % β -Mercaptoethanol (v/v) für die Probindenaturierung unter reduzierenden Bedingungen)
Elektrophoresepuffer:	25 mM Tris-HCl; 250 mM Glycin; 0,1 % SDS (w/v); pH 8,3
Färbelösung:	0,15% Coomassie Blue R250 (w/v); 50 % Ethanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v)
Entfärbelösung:	50 % Ethanol (v/v); 10 % Essigsäure (v/v)

Die zu analysierenden Proteinlösungen wurden mit Probenpuffer versetzt, 5-10 min bei 95 °C erhitzt und auf das Gel aufgetragen (vertikales Minigel 100 mm x 80 mm x 1,5 mm und „Mini-Protean II“ Gelkammer von Biorad). Die Elektrophorese wurde im Sammelgel bei 120 V, im Trenngel bei 160 V durchgeführt. Zur Detektion der aufgetrennten Proteine wurden die Gele in Coomassie-Färbelösung bei leichtem Schwenken gefärbt und anschließend in Entfärbelösung und H₂O entfärbt.

Elektrophoretischer Mobilitätsschiftassay (EMSA)

Die Fähigkeit von AIF-Fusionsproteinen, DNA zu binden, wurde in Gelretardationsexperimenten untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen der AIF-Fusionsproteine mit 2,5 μ g DNA-Marker für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit DNA-Ladepuffer versetzt und im 1 %igen Agarosegel bei 80 V elektrophoretisch getrennt. Ansätze ohne Zugabe von Protein dienten der Kontrolle.

2.2.9 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

LB-Medium:	siehe 2.2.1
Ampicillin:	100 mg/ml in H ₂ O; Gebrauchskonzentration: 100 μ g/ml
IPTG:	0,5 M in H ₂ O

Die Expression rekombinanter Proteine wurde, sofern nicht anders angegeben, im *E. coli*-Stamm BL21-

CodonPlus(DE3)-RIL durchgeführt. In 100 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium wurden Übernachtskulturen aus einzelnen Bakterienklonen bei 37 °C herangezogen. Mit diesen Kulturen wurden Expressionskulturen größeren Volumens angeimpft (100-1000 ml). Dazu wurde die Vorkultur mindestens 1:20 in vorgewärmtem Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-1,0 kultiviert. Die Proteinexpression wurde durch Zugabe von 0,5 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Die Expressionskulturen wurden üblicherweise weitere 1-5 h bei 20-37 °C unter Schütteln inkubiert, für 10 min bei 7500 g zentrifugiert, die Überstände verworfen und die Bakterienpellets lysiert oder bis zur Isolierung der rekombinanten Proteine bei -20 °C gelagert.

Zur Analyse der Proteinexpression durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung oder Western blot wurden je 1 ml der Kultur entnommen, 5 min bei 7500 g in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 100 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Von dem Lysat wurden 5 bis 20 µl pro Spur auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.10 Expression rekombinanter Proteine in der Hefe *Pichia pastoris*

Die Expression rekombinanter Proteine in der Hefe *Pichia pastoris* wurde im Wesentlichen nach Herstellerangaben des „*Pichia* Expression kit“ (Invitrogen) durchgeführt. Die DNA-Konstrukte, die für die in dieser Arbeit hergestellten rekombinanten Proteine kodieren, wurden in den Hefeexpressionsvektor pPIC9 kloniert, der aufgrund seiner homologen Flanken zum Hefegenom zu einer chromosomalen Insertion der DNA-Konstrukte durch homologe Rekombination führt. Aufgrund des Plasmid-kodierten α-Faktor Sekretionssignals wurden die exprimierten Proteine in den Kulturüberstand sekretiert.

BMGY-Medium: 1 % Hefeextrakt (w/v); 2 % Pepton (w/v); 100 mM Kaliumphosphat pH 7,5;
1,34 % Yeast Nitrogen Base (mit (NH₄)₂SO₄ / ohne Aminosäuren) (w/v);
4x10⁻⁵ M Biotin; 1 % Glycerin (v/v)

BMMY-Medium: wie BMGY, jedoch 0,5 % Methanol (v/v) statt 1 % Glycerin (v/v)

Expressionsstudien

Zur Analyse der Proteinexpression wurden Hefeklone, die mit dem gewünschten DNA-Konstrukt transformiert und auf Histidin-freiem Minimalmedium selektioniert waren, im kleinen Maßstab angezogen. Dazu wurden je 10 ml BMGY-Medium mit einem Hefeklon von einer MD-Platte beimpft und die Kultur bei 30 °C für 2 Tage im Schüttler inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurden die Kulturen bei 1500 g abzentrifugiert und in Methanol-haltigem BMMY-Medium resuspendiert. Um die Induktion der Proteinexpression aufrechtzuerhalten, wurde alle 24 h 1-2 % Methanol (Endkonzentration) zugegeben. Die Kulturen wurden weitere 3-4 Tage inkubiert. Zur Analyse der Proteinexpression wurden vor der Induktion sowie alle 24 h Proben entnommen.

Die Hefen wurden abzentrifugiert, die Überstände abgenommen und sekretierte rekombinante Proteine im Western blot detektiert. Zur Analyse der intrazellulären Fraktion wurde das Zellpellet bei der vorherigen Zentrifugation im gleichen Volumen BMMY resuspendiert. Aliquote hiervon wurden lysiert und ebenfalls im Western blot analysiert.

Kulturen zur Analyse der Expressionslevels von MBP- und GST-Fusionsproteinen wurden im 25 ml Maßstab kultiviert und ansonsten analog behandelt.

Präparative Expression von Proteinen in *Pichia pastoris*

Im präparativen Maßstab wurden rekombinante Proteine in 500 ml *Pichia*-Kulturen exprimiert. Dazu wurde zunächst eine 10 ml Vorkultur in BMGY-Medium angeimpft und für zwei Tage bei 30 °C inkubiert. Mit der Vorkultur wurde eine 100 ml BMGY-Kultur angeimpft und diese einen Tag bei 30 °C inkubiert. Zur Induktion der Proteinexpression wurde diese Kultur in 1000 ml BMMY-Medium verteilt auf zwei Schüttelkolben überführt. Die Expressionskultur wurde weitere 3-4 Tage bei 25-30 °C inkubiert und alle 24 h mit 1-2 % Methanol (Endkonzentration) versetzt. Durch Zentrifugation wurden die Zellen abgetrennt und rekombinante Proteine aus den Überständen, wie in Abschnitt 2.2.12 beschrieben, gereinigt.

2.2.11 Periplasmapräparation aus *E. coli* Expressionskulturen

Periplasmapuffer: 50 mM Tris; 20 % Sucrose (w/v); 1 mM EDTA; pH 8,0

Die Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* mit anschließender Sekretion in den periplasmatischen Raum erlaubt das Ausbilden von Disulfidbrücken aufgrund der oxidierenden Bedingungen im Periplasma. Dies wird durch verschiedene periplasmatische und Membranproteine unterstützt. Zur Expression funktionaler rekombinanter Proteine, die durch Disulfidbrücken stabilisiert werden, ist es daher generell von Vorteil, diese Proteine in das bakterielle Periplasma zu leiten. Dies kann durch das Anhängen N-terminaler Signalsequenzen erreicht werden. Für diesen Zweck wurde in dieser Arbeit das *ompA* Sekretionssignal des „outer membrane protein A“ von *E. coli* verwendet.

Zur Steigerung der Ausbeute an löslichem Protein wurde die Kultivierung der *E. coli* Expressionskulturen bei reduzierten Temperaturen (20-25 °C) durchgeführt. Bakterienpellets aus induzierten 1 l Kulturen wurden in 50 ml Periplasmapuffer resuspendiert und für 1 h auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation bei 30000 g für 30 min bei 4 °C wurden unlösliche Bestandteile entfernt. Die erhaltenen Periplasmafraktionen wurden durch einen Faltenfilter filtriert und zur Reinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie eingesetzt. Für die Periplasmapräparation aus Bakterienkulturen in kleinerem Maßstab wurden entsprechend reduzierte Volumina eingesetzt.

2.2.12 Reinigung rekombinanter Proteine durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie unter nativen Bedingungen

Auftragspuffer (Puffer A): 1 M NaCl in PBS; pH 8,0

Puffer B: Puffer A + 1 M Imidazol

Einige in dieser Arbeit hergestellte rekombinante Proteine enthielten jeweils Abschnitte aus sechs Histidinen, die eine Reinigung der rekombinanten Proteine mittels Ni²⁺-Affinitätschromatographie erlaubten.

Zur Reinigung rekombinanter Proteine aus Zellysaten von induzierten Bakterien wurden Pellets aus 1 l Kulturen in 35 ml Auftragspuffer resuspendiert und mit Hilfe einer „French Press“ oder durch Ultraschall aufgeschlossen. Die Suspension wurde bei 25000 g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert, durch einen Faltenfilter filtriert und zur Reinigung durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie eingesetzt.

Zur Reinigung von rekombinanten Proteinen aus Periplasmafraktionen von *E. coli* wurden die Proben, wie im Abschnitt 2.2.11 angegeben, vorbereitet.

Zur Reinigung rekombinanter Proteine aus *Pichia pastoris* Kulturüberständen wurden Expressionskulturen bei 7500 g abzentrifugiert und die Überstände auf einen pH-Wert von 8 eingestellt. Präzipitate wurden durch Filtration durch einen 22 µm Filter entfernt. Amersham C10/10 Säulen wurden mit 2-5 ml suspendierter „Chelating FastFlow Sepharose“ gefüllt und mit 20 Bettvolumen H₂O gewaschen. Anschließend wurden 10 ml 2 %ige NiSO₄-Lösung durch die Matrix gepumpt und ungebundene Ni²⁺-Ionen durch Waschen mit 10 Bettvolumen H₂O entfernt. Alternativ wurden die Säulen mit 2-5 ml „Ni-NTA-Fastflow Chelating Sepharose“ gefüllt. Bei der Reinigung rekombinanter Proteine aus *Pichia pastoris* Kulturüberständen konnte durch Verwendung dieses Säulenmaterials die Ausbeute an gereinigtem Protein gesteigert werden. Die Äquilibration der Säule erfolgte jeweils mit 10 Bettvolumen des Auftragspuffers. Die vorbereiteten Proben wurden mit einer Flußrate von 0,5 ml/min durch die Säule gepumpt. Danach wurde die Säule mit ca. 10 Bettvolumen 10 mM Imidazol enthaltendem Auftragspuffer gewaschen. Spezifisch gebundene Proteine wurden in etwa 5 ml 250-500 mM Imidazol enthaltendem Auftragspuffer eluiert. Noch an die Säule gebundene Proteine wurden mit 100 mM EDTA-Lösung zusammen mit den Ni²⁺-Ionen eluiert. Die Elutions-, Wasch- und Durchflußfraktionen wurden mittels SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und im Western blot analysiert.

2.2.13 Reinigung rekombinanter Proteine aus *E. coli* durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen

Auftragspuffer (Puffer A): 8 M Harnstoff; 500 mM NaCl in PBS; pH 8,0

Puffer B: Puffer A + 1 M Imidazol

Pellets von induzierten 1 l Bakterienkulturen wurden in 35 ml Auftragspuffer resuspendiert und mit der „French Press“ aufgeschlossen. Die Proben wurden, wie unter 2.2.12 beschrieben, zentrifugiert, filtriert

und auf eine äquilibrierte Säule aufgetragen. Zur Proteinreinigung wurden Harnstoff-haltige Puffer verwendet. Die Elutions-, Wasch- und Durchflußfraktionen wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung oder im Immunoblot analysiert. Proteinhaltige Elutionsfraktionen wurden vereinigt und für die Renaturierung eingesetzt.

2.2.14 Analytische Gelfiltration

Laufpuffer: 1 mM DTT in PBS

Die tetramere Natur von SA-5 (vgl. Abschnitt 3.1) wurde durch analytische Gelfiltration untersucht. Dazu wurde gereinigtes SA-5 in PBS auf eine mit Laufpuffer äquilibrierte Superose 6 HR 10/30 Gelfiltrations-säule (Amersham) aufgetragen.

Die Trennung erfolgte bei einer Flußrate von 0,5 ml/min bei 4 °C auf einem ÄktaFPLC System. Die Molekulargewichtsbestimmung der SA-5 Oligomere erfolgte durch Abgleich mit Markerproteinen bekannten Molekulargewichts (Aldolase 158 kDa, Ferritin 440 kDa, Katalase 230 kDa, Thyroglobulin 669 kDa), die unter identischen Bedingungen auf der Gelfiltrationssäule getrennt wurden.

2.2.15 Renaturierung gereinigter rekombinanter Proteine

In dieser Arbeit wurden ausschließlich gereinigte Proteine zurückgefaltet und es wurde darauf geachtet, daß die Proteinkonzentration bei der Renaturierung stets kleiner als 10 µg/ml war, um intermolekulare Interaktionen während der Renaturierung zu verringern. Bei der Renaturierung ohne vorherige Reduktion wurde darauf geachtet, daß die Proben vom Zeitpunkt des Zellaufschlusses bis zur Renaturierung schnell verarbeitet wurden.

Renaturierung ohne vorherige Reduktion

Zur Renaturierung ohne vorherige Reduktion wurden die denaturierend gereinigten Proteine vor der Dialyse auf 400 mM L-Arginin eingestellt, da durch Zugabe hoher Mengen an L-Arginin eine Präzipitation während der Dialyse verhindert werden kann (Buchner und Rudolph, 1991). Danach wurde gegen ein 100-faches Volumen Dialysepuffers, der 400 mM L-Arginin enthielt, bei 4 °C über Nacht dialysiert und anschließend das L-Arginin durch schrittweises Verdünnen des Dialysepuffers entfernt.

Renaturierung mit vorheriger Reduktion

Renaturierungspuffer: 100 mM Tris pH 8,0; 8 mM oxidiertes Glutathion; 0,5 M L-Arginin;
150 mM NaCl

Bei der Renaturierung mit vorheriger Reduktion wurden denaturierend gereinigte Proteine zunächst reduziert und dann in einem Redoxpuffersystem renaturiert. Dazu wurde die Proteinlösung mit 0,3 M Dithioerythriol bei Raumtemperatur für 2 h reduziert und anschließend 50-fach in Renaturierungspuffer verdünnt. Die Renaturierung erfolgte für mindestens 48 h bei 10 °C. Anschließend wurden die Proben bei 35000 g für 30 min zentrifugiert, um präzipitierte Proteinaggregate abzutrennen. Verdünnte renaturierte Proteine wurden in einem Dialyseschlauch in Polyethylenglycol 35000 oder durch Ultrafiltration aufkonzentriert, erneut zentrifugiert und mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte densitometrisch im Coomassie-gefärbten Gel im Vergleich zu BSA-Standardkonzentrationen.

2.2.16 Immunodetektion von Proteinen (Western blot)

Kathodenlösung:	25 mM Tris pH 10,4; 40 mM 6-Aminohexansäure; 20 % Ethanol (v/v)
Anodenlösung I:	30 mM Tris pH 10,4; 20 % Ethanol (v/v)
Anodenlösung II:	300 mM Tris pH 10,4; 20 % Ethanol (v/v)
TTBS:	10 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 0,05 % Tween-20 (v/v)
blocking Lösung:	5 % Magermilchpulver (w/v) in TTBS
AP-Puffer:	100 mM Tris (pH 9,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl ₂
NBT-Lösung:	0,5 g Nitro-Blau Tetrazoliumchlorid (NBT) in 10 ml 70 % Dimethylformamid (DMF) (v/v)
BCIP-Lösung:	0,5 g 5-Brom-4-Chlor-3-indoyl Phosphat (BCIP) in 10 ml Dimethylformamid
AP-Substratlösung:	66 µl NBT-Lösung; 33 µl BCIP Lösung; 10 ml AP-Puffer
Stripping buffer:	2 % SDS (w/v); 100 mM DTT

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine (vgl. 2.2.8) wurden in Halbtrockenblotkammern (Froebel, Lindau) auf Immobilon-P Membranen (Millipore) übertragen (Blotaufbau: Drei Lagen Whatman 3MM Papier in Anodenpuffer I, drei Lagen in Anodenpuffer II, Membran, SDS-Polyacrylamidgel, drei Lagen 3MM Papier in Kathodenpuffer). Die Membran wurde vorher kurz in Methanol und anschließend in Anodenpuffer II getränkt. Die Elektrophorese erfolgte für 1-2 h bei 1 mA/cm² Membranfläche. Folgende Antikörper und Nachweisreagenzien wurden in den angegebenen Verdünnungen eingesetzt:

Antikörper	Konzentration	Verdünnung
anti-Myc 9E10 (Myc-Epitop)	1,6 µg/ml	1:500
SWA11 (SWA11-Epitop)	0,6 µg/ml	1:1000
anti-Granzym B 2C5	200 µg/ml	1:1000
Anti-MBP MBP-17		1:1000

Antikörper	Konzentration	Verdünnung
anti-Caspase-3 E-8	200 µg/ml	1:1000
anti-Glutathion-S-Transferase		1:2000
Ziege anti-Maus IgG, HRP-gekoppelt		1:5000
Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt		1:10000
Schaf anti-Ziege IgG, HRP-gekoppelt		1:7000
Streptavidin AP-gekoppelt		1:5000

Zur Absättigung der auf der Polyvinyliden Fluorid (PVDF)-Membran vorhandenen Proteinbindungsstellen wurden die zu analysierenden Membranen 30-60 min mit blocking Lösung inkubiert und anschließend je dreimal 5-10 min mit TTBS-Puffer gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper in blocking Lösung erfolgte für 1-3 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht, die Inkubation mit dem zweiten, Enzym-konjugierten Antikörper ebenfalls in blocking Lösung für 30-60 min. Zwischen sowie nach beiden Inkubationsschritten wurde die Membran wie zuvor mit TTBS gewaschen.

Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden bei Verwendung von HRP-gekoppelten Zweitantikörpern mit Hilfe des ECL-Chemilumineszenz-Systems (Amersham) nach Herstellervorschrift nachgewiesen und durch Auflegen eines Röntgenfilms für einige Sekunden bis 15 Minuten visualisiert. Bei Verwendung von AP-gekoppelten Zweitantikörpern wurde die Membran in Substratlösung inkubiert, bis Banden sichtbar waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM EDTA-Lösung gestoppt.

Entfernen von Antikörper-Komplexen von der PVDF-Membran

Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Inkubation der Western blot Membran in 2 % SDS und 100 mM DTT bei 70 °C für 1-2 h gelöst und gebundene Antikörper von der Membran entfernt. Die Membran wurde danach wie oben beschrieben mit TTBS gewaschen und mit blocking Lösung für eine Stunde geblockt. Anschließend wurde die Membran mit einem anderen Antikörper erneut inkubiert.

2.2.17 Deglykosylierung der in *Pichia pastoris* exprimierten Proteine

Um zu untersuchen, ob in der Hefe *Pichia pastoris* exprimierte Granzym B Fusionsproteine glycosyliert sind, wurden die gereinigten Proteine mit N-Glycosidase F (Roche) behandelt und anschließend ihr Molekulargewicht im Vergleich zu nicht behandelten Proteinen im Western blot analysiert. Ca. 1 µg Protein in 10 µl PBS wurde mit 1 µl 10 % SDS-Lösung versetzt und für 10 min auf 95 °C erhitzt. In einem Gesamtvolumen von 100 µl (PBS) wurden anschließend 1 U N-Glykosidase F sowie 0,5 % Triton X-100 zugegeben und der Ansatz über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.18 Bindungsstudien

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

blocking Lösung:	3 % BSA in PBS bzw. in TBS (w/v)
9E10:	1 µg/well in 0,5 % BSA in PBS bzw. in TBS (w/v)
Biotin, AP-Konjugat	1 µg/well in 0,5 % BSA in TBS (w/v)
Ziege anti-Maus IgG, AP-Konjugat:	1:4000 in 0,5 % BSA in TBS (w/v)
Ziege anti-Maus IgG, HRP-Konjugat:	1:5000 in 0,5 % BSA in PBS (w/v)
AP-Puffer:	100 mM TRIS, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl ₂ ; pH 9,5
Entwicklungspuffer (HRP):	ABTS-Detektionssystem (Roche)
Entwicklungspuffer (AP):	0,5 mg/ml <i>p</i> -Nitrophenylphosphat in AP-Puffer frisch angesetzt

Die Fähigkeit, chemisch biotinylierter Proteine an Streptavidin zu binden, wurde in einem ELISA-ähnlichen Verfahren untersucht.

Die Bindung von GrB-5 und GrB_{S183A}-5 an ErbB2 sowie die Bindung von SA-5 an ErbB2 und an Biotin-konjugierte Alkalische Phosphatase wurde ebenfalls in einem ELISA-ähnlichen Verfahren untersucht.

Je „well“ wurden 100 ng Streptavidin, 100 ng ErbB2₁₋₂₂₂ oder 100 ng BSA als Kontrollprotein auf einer 96 well Mikrotiterplatte in 100 µl PBS bzw. TBS über Nacht bei 4 °C immobilisiert. Freie Bindungsstellen wurden mit je 200 µl blocking Lösung für eine Stunde bei Raumtemperatur abgesättigt. Die zu testenden Proteine wurden in unterschiedlichen Verdünnungen in 0,5 % BSA in PBS (bzw. 0,5 % BSA in TBS) für 1-2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl PBS (bzw. TBS) wurde der jeweilige Erstantikörper bzw. das Biotin-AP Konjugat in 100 µl 0,5 % BSA/PBS (bzw. TBS) zugegeben und für eine Stunde inkubiert. Die Ansätze wurden gewaschen und gebundenes Protein zur Detektion mit Zweitantikörper (100 µl/well, 1 h) markiert. Im Falle der Detektion von ErbB2 gebundenem SA-5 mit dem Biotin-AP Konjugat entfiel die Inkubation mit einem Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen wurde die Färbereaktion durch Zugabe von 100 µl je well Entwicklungspuffer gestartet. Bei ausreichender Färbung der Ansätze erfolgte die Bestimmung der Absorption bei 405 nm gegen die Absorption bei 490 nm in einem Spektrophotometer (Molecular Devices Spectra MAX 340).

Durchflußcytometrie (FACS)

Fusionsproteine und Proteinkomplexe, die den ErbB2-spezifischen „single chain“ Antikörper scFv(FRP5) oder den EGFR Liganden TGFα enthielten, wurden mittels Durchflußcytometrie auf Zellbindung an ErbB2 oder EGFR exprimierende Zellen untersucht. Dazu wurden ca. 5×10^5 der entsprechenden Zellen in einer 96 well „round bottom“ Platte mit 0,5-1,5 µg des zu testenden rekombinanten Proteins in einem Volumen von 50 µl in PBS für 1 h bei 4 °C inkubiert. Die Zellen wurden mit 250 µl PBS gewaschen, für

3 min bei 450 g in einer Megafuge (Heraeus) abzentrifugiert und 30 min bei Raumtemperatur mit 1-2 µg des entsprechenden Erstantikörpers in 50 µl PBS inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurden gebundene Proteine durch einstündige Inkubation der Zellen mit 50 µl eines PE-gekoppelten anti-Maus IgG Antikörpers (Dianova), der 1:50 in PBS verdünnt wurde, markiert. Nicht gebundene Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen mit 250 µl PBS entfernt. Anschließend wurden die Zellen in 500 µl PBS aufgenommen und mit einem FACScan (Beckton Dickinson) auf Bindung der rekombinanten Proteine analysiert.

2.2.19 Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B

Spaltung von rekombinanter Procaspase-3 durch Granzym B *in vitro*

Reaktionspuffer: 10 mM Hepes; 140 mM NaCl; 2,5 mM CaCl₂; pH 7,4
 Ac-IETD-CHO: 20 mM in DMSO

Die enzymatische Aktivität von rekombinantem Granzym B wurde anhand der Spaltung von Caspase-3 als physiologisches Substrat von Granzym B nachgewiesen. Dazu wurde eine rekombinante Form der Procaspase-3 verwendet, die als His-tag Fusionsprotein mit C-terminalem SWA11-Epitop in *E. coli* exprimiert wurde (Giesübel, 2003).

200 ng Procaspase-3 wurden je Ansatz als Substrat in Spaltreaktionen eingesetzt. Diese wurden in einem Gesamtvolumen von 40 µl in Reaktionspuffer bei 37 °C für 14 h inkubiert. Von den zu untersuchenden Granzym B Präparationen (in PBS) wurden jeweils 200 ng zugegeben. Die Reaktionsansätze wurden durch SDS-PAGE getrennt und im Immunoblot durch Detektion des C-terminalen SWA11-Epitops der Procaspase-3 mit dem mAk SWA11 analysiert. Nicht prozessierte Procaspase-3 sowie das P12 Spaltprodukt konnten so detektiert werden.

Die Spezifität der Spaltreaktion wurde durch Verwendung der enzymatisch inaktiven Enzymmutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T, oder durch Zugabe des GrB Peptidinhibitors Ac-IET-CHO untersucht.

Spaltung colorimetrischer Peptidsubstrate

Reaktionspuffer : 50 mM Hepes; 100 mM NaCl; 10% Saccharose (w/v); pH 7,4
 DTT: 100 mM in H₂O
 Ac-IETD-pNA, Ac-IETD-CHO: 20 mM in DMSO

Zum Nachweis der enzymatischen Aktivität von Granzym B Fusionsproteinen wurde ein colorimetrisches Peptidsubstrat mit Granzym B Erkennungssequenz verwendet (Acetyl-Ile-Glu-Tyr-Asp-*p*-Nitroanilid). Spaltung dieses Substrats durch Granzym B setzt *p*-Nitroanilin frei, das eine Gelbfärbung hervorruft.

Die Reaktionen wurden in 96 well Mikrotiterplatten in einem Volumen von jeweils 100 μ l in Reaktionspuffer und 1 μ l Substrat-Lösung (200 μ M Endkonzentration) durchgeführt. Granzym B und Granzym B Fusionsproteine wurden in unterschiedlichen Konzentrationen zugegeben. Die Ansätze wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Farbentwicklung anhand der Absorption bei 405 nm gegenüber der bei 490 nm in einem Spektrophotometer (Molecular Devices Spectra MAX 340) bestimmt. Die Spezifität der Spaltreaktion wurde durch Vorinkubation von Granzym B mit dem spezifischen Peptid-Aldehyd-Inhibitor Acetyl-Ile-Glu-Tyr-Asp-Aldehyd (Ac-IETD-CHO), 400 μ M Endkonzentration) für 15 min bei Raumtemperatur vor Zugabe des Peptid-Substrats nachgewiesen.

2.2.20 Biotinylierung gereinigter Proteine *in vitro*

Sulfo-NHS-Biotin: (Sulfosuccinimidobiotin, Pierce)

500 μ g gereinigtes EGFP, ETA42 oder GrB verdünnt in 1 ml PBS wurden mit 30 μ g Sulfo-NHS-Biotin versetzt und 3 h auf Eis inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch Dialyse gegen PBS sowie gegen Avidin in PBS entfernt. Die effiziente Biotinylierung der Proteine wurde mittels SDS-PAGE und Western blotting mit Streptavidin-konjugierter Alkalischer Phosphatase sowie mit einer ELISA-ähnlichen Methode überprüft (vgl. Abschnitt 2.2.18).

Zur Bildung bifunktionaler Komplexe, bestehend aus SA-5 und dem jeweiligen biotinylierten Protein (bEGFP, bETA42 oder bGrB), wurden die beiden Proteine in den gewünschten molaren Verhältnissen zueinander in PBS für 10-30 min auf Eis inkubiert. SA-5, das mit den nicht biotinylierten Varianten der Proteine inkubiert wurde, diente der Kontrolle. Die an entsprechender Stelle angegebenen molaren Verhältnisse von SA-5 und biotinylierten Proteinen beziehen sich jeweils auf die monomere Form des SA-5 Fusionsproteins.

2.2.21 Herstellung von Gesamtzellextrakt

NETN-Puffer: 20 mM Tris; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA, 0,5 % Nonidet P-40 (w/v);
10 % Glycerol (v/v), 1 mM DTT; pH 8,0

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Kulturen etablierter adhärent wachsender Tumorzelllinien wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in 200 μ l NETN-Puffer je 10^7 Zellen für 15 min auf Eis lysiert. Unlösliche Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation entfernt. Die Gesamtprotein-konzentrationen der Zellextrakte wurden im Bradford-Assay bestimmt (Bradford, 1976). Die Zellextrakte wurden durch SDS-PAGE getrennt und im Western blot analysiert.

2.2.22 Immunfluoreszenzfärbung

Formaldehyd:	4 % in PBS (w/v)
Triton X-100:	0,1 % in PBS (v/v)
BSA:	3 % in PBS (w/v)
anti-Granzym B mAk 2C5:	0,5 $\mu\text{g/ml}$
anti-Streptavidin Antiserum:	1:6600
9E10	1 $\mu\text{g/ml}$
M2 anti-FLAG	1 $\mu\text{g/ml}$
SA-5/EGFP	4 nM SA-5, molares Verhältnis SA-5/bEGFP 1:8
GrB-Fusionsproteine	10 $\mu\text{g/ml}$
AIF-Fusionsproteine	10 $\mu\text{g/ml}$
anti-Maus IgG, Alexa488-	
Konjugat:	1:1000
anti-Kaninchen IgG, FITC-	
Konjugat:	1:50
Eindeckmedium:	Vectashield mit Propidiumjodid oder DAPI (Alexa)

Die Aufnahme von Proteinen in Zellen sowie deren intrazelluläre Lokalisation wurden durch Immunfluoreszenzfärbungen nachgewiesen. Dazu wurden 10^4 bis 4×10^4 adhärent wachsende Zellen auf „8 well“ Diagnostik Objektträgern (adhäsiv Epoxy-beschichtet, Roth) in $50 \mu\text{l}$ je well ausgesät und über Nacht kultiviert. Zur Behandlung der Zellen mit Proteinen wurde das Medium vorsichtig abpipettiert und die Proteine in der gewünschten Konzentration in Zellkulturmedium in einem Gesamtvolumen von $50 \mu\text{l}$ auf die Zellen gegeben. Um die Aufnahme der Proteine in die Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen für 1 h bei 37°C in Gegenwart des jeweiligen Proteins inkubiert, gewaschen und für weitere 1-4 h bei 37°C inkubiert. Zum Nachweis der Zellbindung erfolgte die Inkubation für 1 h auf Eis.

Ungebundenes Protein wurde durch zweimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden mit $40 \mu\text{l}$ Formaldehyd-Lösung je well 10 min bei Raumtemperatur fixiert, erneut gewaschen, mit Triton X-100-Lösung ($20 \mu\text{l/well}$) 5 min permeabilisiert und nochmal gewaschen.

Gebundene bzw. aufgenommene Proteine wurden mit dem jeweiligen Antikörper in der angegebenen Verdünnung in 3% BSA/PBS ($50 \mu\text{l/well}$) detektiert (1 h, Raumtemperatur). Ungebundener Antikörper wurde durch Waschen mit PBS entfernt. Die Färbung erfolgte mit Alexa488-gekoppeltem anti-Maus IgG (Molecular Probes) bzw. FITC-gekoppeltem anti-Kaninchen IgG (Dianova), ebenfalls verdünnt in 3%BSA/PBS (1 h, Raumtemperatur). Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen mit Vectashield Eindeckmedium, das Propidiumjodid bzw. DAPI zum Anfärben der Zellkerne enthielt, eingedeckt und mit einem Nikon Eclipse TE300 Fluoreszenzmikroskop bzw. einem Leica TCS SL konfokalen Laser-scanning-Mikroskop analysiert.

Um Bindung und Aufnahme von SA-5/bEGFP Komplexen in Zellen zu untersuchen, wurden Zellen wie oben beschrieben behandelt, allerdings wurden sie weder permeabilisiert noch fixiert, da die Fluoreszenz des EGFP direkt gemessen wurde und keine Inkubation mit Antikörpern notwendig war.

2.2.23 Cytotoxizitätstest (MTT)

MTT:	(Sigma) 7,5 mg/ml in PBS
Lysepuffer:	20 % SDS (w/v) in 50 % Dimethylformamid (v/v); pH 4,7 einstellen mit 80 % Eisessig (v/v) / 20 % 1 M HCl (v/v)
Chloroquin:	50 bzw. 100 μ M

Die cytotoxische Wirkung der in dieser Arbeit abgeleiteten Proteine wurde anhand der Überlebensrate etablierter Tumorzellen nach Behandlung mit diesen Proteinen untersucht. Zur Quantifizierung wurde der colorimetrische MTT-Cytotoxizitätsassay verwendet, der auf der Metabolisierung des gelben Tetrazolium-Salzes MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid) zu einem braunen Formazan-Produkt basiert.

Je nach Proliferationsrate der eingesetzten Zelllinie wurden 10^4 - 5×10^4 Zellen in 200 μ l Medium pro well in der Gegenwart des jeweiligen Proteins in Triplikaten für die angegebenen Zeiten kultiviert. Alle zu testenden Proteine wurden vor der Verwendung gegen PBS dialysiert. Zur Bestimmung der Überlebensrate wurden 10 μ l MTT-Lösung je well zu den Zellen gegeben und diese für weitere 2-4 h bei 37 °C kultiviert. Die Zellen wurden durch Zugabe von 90 μ l Lysepuffer je well bei 37 °C für 2 h oder über Nacht lysiert. Die Farbentwicklung wurde durch Messung der Absorption bei 590 nm quantifiziert und die Überlebensrate aus den Meßwerten relativ zu Zellen, die nur in Medium kultiviert waren, berechnet. Die Überlebensrate von Zellen, die in Gegenwart des endosomolytischen Reagenz Chloroquin zusammen mit Proteinen kultiviert waren, wurde relativ zu Zellen, die nur mit Chloroquin inkubiert waren, berechnet. Ansätze, in denen keine Zellen ausgesät wurden, dienten als Referenzwert (blank). Um die cytotoxische Aktivität von SA-5/bGrB bzw. SA-5/bETA42 Komplexen zu untersuchen, wurden Zellen in Gegenwart von jeweils 5,3 nM SA-5 und bGrB bzw. bETA42 in den angegebenen Konzentrationen kultiviert.

2.2.24 Spaltung und enzymatische Aktivität endogener Caspasen

Caspase-Aktivitätspuffer:	100 mM TRIS, 10 % Sucrose (w/v), 10 mM DTT, 150 mM NaCl, 0,1 % CHAPS (w/v); pH 8
---------------------------	---

Die Spaltung und Aktivierung von endogener Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 durch Granzym B Fusionsproteine wurde im Immunoblot bzw. in colorimetrischen Peptidspaltungsassays untersucht.

A-431 Zellen wurden für 14 h in Gegenwart von Granzym B Fusionsproteinen und 100 μ M Chloroquin inkubiert. Einigen Ansätzen wurde der Caspaseninhibitor Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-

fluormethylketon (zVAD-fmk) zusammen mit dem jeweiligen Protein zugesetzt. Zellysate wurden, wie im Abschnitt 2.2.21 beschrieben, hergestellt. Jeweils 50 μ g dieser Extrakte wurden im SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und Procaspase-3 sowie die P20 und P17 Spaltprodukte im Western blot mit dem Caspase-3 spezifischen mAk E-8 detektiert.

Zur Messung der enzymatischen Aktivität endogener Caspasen wurden die Zellextrakte mit den Peptidsubstraten Ac-IETD-AFC (Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-AFC; AFC: 7-Amido-4-trifluoromethylcoumarin), Ac-LEHD-AFC (Acetyl-Leu-Glu-His-Asp-AFC) und Ac-DEVD-pNA (Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-*p*-Nitroanilid) inkubiert, die bevorzugt durch Caspase-8, Caspase-9 bzw. Caspase-3 gespalten werden. Jeweils 37 μ M der fluorimetrischen Substrate Ac-IETD-AFC oder Ac-LEHD-AFC wurden mit 20 μ g Gesamtprotein in einem Volumen von 150 μ l in Caspase-Aktivitätspuffer für 2 h bei 37 °C inkubiert. Messung der Fluoreszenz erfolgte in einem „Bio Rad Fluoromark microplate reader“. Das colorimetrische Substrat Ac-DEVD-pNA zur Messung der enzymatischen Aktivität von Caspase-3 wurde in einer Konzentration von 266 μ M eingesetzt und mit Zellextrakten inkubiert, die 50 μ g Gesamtprotein enthielten. Zur Quantifizierung der Färbung wurde die Absorption bei 405 nm und 490 nm nach Inkubation für 14 h bei 37 °C in einem Photometer (Molecular Devices Spectra MAX 340) gemessen.

2.2.25 Hoechst-Färbung

Hoechst 33342:	5 mg/ml in H ₂ O
Propidiumjodid:	1 mg/ml in H ₂ O
Hoechst Färbelösung:	5 μ g/ml Hoechst 33342; 1 μ g/ml Propidiumjodid in PBS

Morphologische Veränderungen des Zellkerns wurden durch Färbung der zellulären DNA mit Hoechst 33342 detektiert, einem Fluoreszenzfarbstoff, der intakte Zellmembranen durchdringt, so daß apoptotische wie nicht-apoptotische Zellen angefärbt werden. Die Zellen wurden mit Trypsin von der Kulturschale abgelöst, mit dem zuvor abpipettierten Überstand vereinigt, durch Zentrifugation pelletiert, in 20 μ l Färbelösung je Ansatz resuspendiert und 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis gelagert und möglichst schnell mikroskopisch analysiert. Dazu wurden ca. 10 μ l der Zellsuspension auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckglas abgedeckt und die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop mit UV-Anregung analysiert. Als Positivkontrolle für eine apoptotische Kernmorphologie wurden Zellen mit dem Kinaseinhibitor Staurosporin behandelt (1 μ M).

2.2.26 Mikroinjektion

Um die cytotoxische Aktivität von AIF und GrB Fusionsproteinen direkt und unter Umgehung des Aufnahmeweges in die Zelle zu untersuchen, wurden gereinigte Proteine in das Cytoplasma injiziert. Dazu wurde ein CompiC INJECT Mikroinjektionssystem (Cellbiology Trading) mit Eppendorf FentoJet Druckgeber und JunAir Compressor verwendet. Je 5×10^4 Zellen wurden auf gelatinisierten Glasboden-Zellkultur-

schalen ausgesät und für zwei Tage im Brutschrank inkubiert. Die Injektion erfolgte in das Cytoplasma von etwa 50 Zellen je Protein. Die zur Injektion eingesetzten Proteinlösungen wurden zuvor so verdünnt, daß sie jeweils äquimolare Konzentrationen der zu untersuchenden Proteine enthielten. Zur Identifizierung injizierter Zellen erfolgte die Injektion der Proteine zusammen mit GFP, das in *E. coli* als GST Fusionsprotein hergestellt wurde. Zur Detektion apoptotischer Kernmorphologie wurden die Zellen direkt vor der mikroskopischen Analyse mit Hoechst 33342 gefärbt (vgl. 2.2.25). Die Morphologie von injizierten und nicht injizierten Zellen wurde nach 14 h unter einem Zeiss Axiovert 200 Fluoreszenzmikroskop untersucht, und Bilder wurden mit einer digital AxioCam CCD Kamera (Zeiss) aufgenommen.

3 Ergebnisse

Nach heutigem Verständnis sind Caspasen die zentralen Effektoren der Apoptose. Aktive Caspasen aktivieren sich gegenseitig, was zu einer Verstärkung apoptotischer Signale führt. Diese Caspasen-Kaskade ist für das sehr schnelle Ablaufen des apoptotischen Zelltods verantwortlich (Strasser, 1999). Insbesondere die Aktivierung von Caspase-3 ist für zahlreiche morphologische Veränderungen apoptotischer Zellen verantwortlich und stellt das Schlüsselereignis für die Exekutionsphase der Apoptose dar (Fischer *et al.*, 2003; Martin, 2003).

Die Dysregulation apoptotischer Signalwege ist eine Grundvoraussetzung für das Entstehen von Tumoren (vgl. Abschnitt 1.5). Die molekularen Mechanismen dieser Dysregulation führen häufig zur Unfähigkeit, Caspasen zu aktivieren. Das gezielte Einbringen proapoptotischer Proteine, die zu einer Aktivierung der Caspasen-Kaskade führen, sollte eine effiziente Strategie darstellen, in diesen malignen Zellen selektiv Apoptose zu induzieren und diese so zu eliminieren.

Hierzu wurden in dieser Arbeit Fusionsproteine abgeleitet, die aus einer proapoptotischen Proteindomäne und einer tumorzellspezifischen Zellbindungsdomäne bestehen. Als Bindungsdomäne mit Affinität für tumorassoziierte Antigene wurde der ErbB2 spezifische „single chain“-Antikörper scFv(FRP5) (Wels *et al.*, 2004; Wels *et al.*, 1992) verwendet, der sich vom monoklonalen Antikörper FRP5 ableitet (Harwerth *et al.*, 1992). Ein Fusionsprotein bestehend aus scFv(FRP5) und einer bakteriellen Effektdomäne (verkürztes *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A) (scFv(FRP5)-ETA) wurde vor kurzem in einer klinischen Studie der Phase I getestet. Als alternative Zellbindungsdomäne wurde im Rahmen dieser Arbeit der hochaffine Ligand des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) „transforming growth factor α “ (TGF α) verwendet. Die Zielstrukturen beider Zellbindungsdomänen, ErbB2 und EGFR, sind Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie, zu der insgesamt vier Rezeptortyrosinkinasen gehören (vgl. 1.5.2). Die Überexpression dieser Rezeptoren hängt häufig kausal mit der malignen Transformation von Tumorzellen zusammen. Insbesondere Überexpression von EGFR und ErbB2 wird in einer Vielzahl humaner Adenokarzinome beobachtet (Slamon *et al.*, 1987) und korreliert mit einer schlechten Prognose für den Patienten (Hynes und Stern, 1994).

Als proapoptotische Effektoren für die selektive Induktion von Apoptose in Tumorzellen wurden die Serinprotease cytotoxischer Lymphocyten Granzym B (GrB) sowie das Flavoprotein „apoptosis inducing factor“ (AIF) eingesetzt.

GrB ist das einzige bisher bekannte Enzym, das die Substratspezifität der Caspasen teilt und durch Spaltung von Caspasen und Caspasensubstraten das apoptotische Zelltodprogramm an verschiedenen Punkten initiieren kann. Die meisten Regulationsmechanismen, die in Tumorzellen dysreguliert sind, wirken in apoptotischen Signalwegen oberhalb von GrB. Das Einschleusen dieser Protease in Form tumorzellspezifischer Fusionsproteine könnte so einen möglichen Ansatz darstellen, um in diesen Tumorzellen Apoptose zu induzieren. In Abschnitt 3.1 sind nicht-kovalent verbundene Komplexe aus Zellbindungsdomäne und GrB dargestellt. Die Konstruktion, eukaryotische Expression sowie die

funktionelle Charakterisierung von GrB Fusionsproteinen ist im Abschnitt 3.2 beschrieben.

Da gerade bei der Verwendung eukaryotischer Expressionssysteme die erzielbaren Ausbeuten bei der Expression rekombinanter Proteine begrenzt sind, die Generierung relativ großer Proteinmengen die funktionelle Charakterisierung der GrB Fusionsproteine aber erleichtert, wurde in dieser Arbeit zudem ein System etabliert, das eine generelle Ausbeutesteigerung von heterolog exprimierten Proteinen in *Pichia pastoris* zulässt und sich für einen vielfältigen Einsatz bei der Expressionsoptimierung rekombinanter Proteine in Hefe eignen könnte (vgl. 3.3).

Als alternativer Effektor zur selektiven Apoptoseinduktion in Tumorzellen wurde in dieser Arbeit das Flavoprotein AIF eingesetzt, das nach gegenwärtigen Kenntnisstand unabhängig von Caspasen Apoptose induzieren kann. Die Ableitung von AIF Fusionsproteinen und deren funktionale Charakterisierung ist im Abschnitt 3.4 beschrieben.

3.1 SA-5 als zellspezifisches Trägerprotein zum selektiven Einschleusen biotinylierter proapoptotischer Proteine in Tumorzellen

Proteine, die aus einer proapoptotischen Effektordomäne und einer Zellbindungsdomäne mit Spezifität für tumorassoziierte Antigene bestehen, repräsentieren eine Klasse neuartiger potentiell therapeutisch einsetzbarer Moleküle zur selektiven und effektiven Eliminierung von Tumorzellen. Die Herstellung solch bifunktionaler Proteine ist jedoch häufig schwierig und sehr zeitintensiv, da beide Proteindomänen unabhängig voneinander agieren müssen und sich bei der Proteinfaltung nicht gegenseitig beeinflussen dürfen. Daneben ist der biologische Effekt von eingeschleusten proapoptotischen Proteindomänen auf die Tumorzelle nicht eindeutig vorhersehbar, da apoptotische Proteine in komplexen Signalkaskaden wirken, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Zudem ist die Dysregulation dieser Signalkaskaden in Tumorzellen eine Grundvoraussetzung für die maligne Transformation.

Ein Protein mit hoher Affinität für ein tumorassoziiertes Antigen auf der einen Seite und Affinität für verschiedene potentiell cytotoxische Proteine auf der anderen könnte die Entwicklung solcher bifunktionaler Fusionsproteine erleichtern.

In dieser Arbeit wurde hierzu ein Fusionsprotein bestehend aus dem ErbB2 spezifischen scFv(FRP5) und core-Streptavidin (SA) konstruiert. Streptavidin ist ein tetrameres Protein, welches von *Streptomyces avidinii* produziert wird und D-Biotin mit extrem hoher Affinität bindet ($K_D=10^{-14}$ M) (Green, 1990). Das hier verwendete core-Streptavidin ist eine verkürzte Variante von Streptavidin (Aminosäuren 13-125), welche die gleiche Affinität zu Biotin aufweist, wie das vollständige Protein. Ein Fusionsprotein bestehend aus scFv(FRP5) und SA sollte die spezifische und aufgrund der hohen Bindungsstärke nahezu irreversible Kopplung des scFv(FRP5) an jedes biotinylierte Biomolekül vermitteln und so das spezifische Einschleusen dieses Proteins in Zielzellen erlauben (Abb. 2.1).

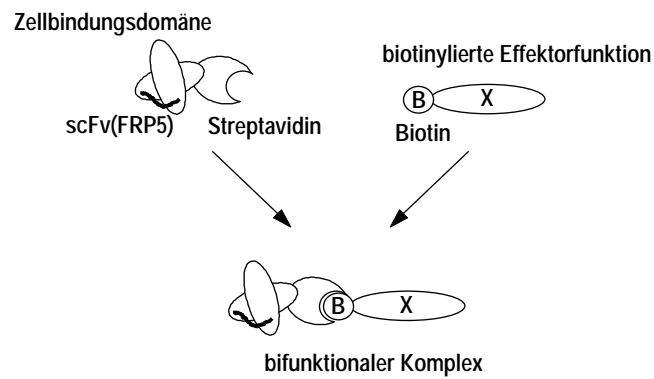


Abb. 2.1 | Ein tumorspezifisches Trägerprotein bestehend aus einer Zellbindungsdomäne und SA (links) sollte die Kopplung biotinylierter Effektormoleküle (rechts) erlauben und diese so mit Spezifität für Tumorzellen ausstatten. Vereinfacht ist das Fusionsprotein hier in monomerer Form und nicht als Tetramer dargestellt.

3.1.1 Konstruktion, Expression, Reinigung und Renaturierung von SA-5

Bisher in der Literatur beschriebene Fusionsproteine, die aus einem scFv Antikörperfragment und SA bestehen, enthalten das Antikörperfragment am N-Terminus gefolgt von einer C-terminalen SA-Domäne (Cheung *et al.*, 2004; Kipriyanov *et al.*, 1995; Pearce *et al.*, 1997; Schmiedl *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2000). In der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls Fusionsproteine mit dieser Domänenorientierung exprimiert. Die Löslichkeit dieser Proteine sowie die funktionelle Aktivität der einzelnen Proteindomänen war allerdings gering (Daten nicht gezeigt). Durch Austausch der beiden Proteindomänen konnte dagegen die Ausbeute an löslichem Protein erheblich gesteigert werden. Das optimierte Fusionskonstrukt, das zur Expression von SA-5 in *Escherichia coli* verwendet wurde, ist schematisch in Abb. 2.2 A gezeigt. Es enthält die SA-domäne am N-Terminus und scFv(FRP5) am C-Terminus. Zur Konstruktion dieses Fusionsproteins wurden DNA-Sequenzen, die für SA und scFv(FRP5) kodieren, in das bereits etablierte Vektorsystem pSW5 kloniert (Rohrbach *et al.*, 2000).

Die cDNA von SA wurde als *Bam*HI/*Bam*HI Fragment aus dem Plasmid pSTE2 (Schmiedl *et al.*, 2000) erhalten („plasmid for streptavidin tagged expression 2“) und in die *Bam*HI Schnittstelle des Plasmids pBIIKS (Stratagene) eingesetzt. Das resultierende Plasmid pBIIKS-SA wurde mit *Sal*I und *Xba*I verdaut und das so erhaltene SA Fragment in die kompatiblen *Sal*I und *Avr*II Restriktionsschnittstellen von pSW5 eingefügt. Das resultierende bakterielle Expressionsplasmid pSW5-SA enthält die cDNA von SA gefolgt von einem Oligonukleotid, das für ein Epitop des monoklonalen Antikörpers 9E10 (Myc-tag) und einen Hexahistidin-tag kodiert. Die DNA, die für scFv(FRP5) gefolgt von einem weiteren Myc-tag und einem His-tag kodiert, wurde mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotidprimer 5'*Nhe*I-scFv(FRP5) und 3'*Xho*I-Stop-His und ein Plasmid, welches die Sequenz des scFv(FRP5) gefolgt von einem Myc- und Hexahistidin-tag enthält (Giesübel, 2003), als „template“ verwendet. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Nhe*I und *Xho*I verdaut und in die entsprechenden Schnittstellen von pSW5-SA eingesetzt. Das resultierende Expressionsplasmid pSW5-SA-scFv(FRP5), das zur

Expression von SA-5 verwendet wurde, ist schematisch in Abb. 2.2 A gezeigt.

Zur Etablierung geeigneter Bedingungen für die bakterielle Expression von SA-5 wurden *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL mit dem Expressionsplasmid pSW5-SA-scFv(FRP5) transformiert und wie im Methodenteil dieser Arbeit beschrieben kultiviert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte für 4 h bei 37 °C. Mit pSW5-SA-scFv(FRP5) transformierte Bakterien wurden in Gegenwart von 0,1 M Glucose kultiviert, um den *tac*-Promotor, der die Expression des Fusionsproteins steuert, zu reprimieren. Diese Repression erwies sich bei der Expression von SA Fusionsproteinen als essentiell, um in Expressionskulturen gute Wachstumsraten zu erlangen (Daten nicht gezeigt). Vermutlich sind SA enthaltende Proteine aufgrund ihrer hohen Affinität zu Biotin toxisch für die herstellenden Bakterien. Die Analyse der Expressionskulturen zeigte, daß SA-5 hauptsächlich als unlösliches Protein in Form von Proteinaggregaten („inclusion bodies“) vorhanden war (Daten nicht gezeigt).

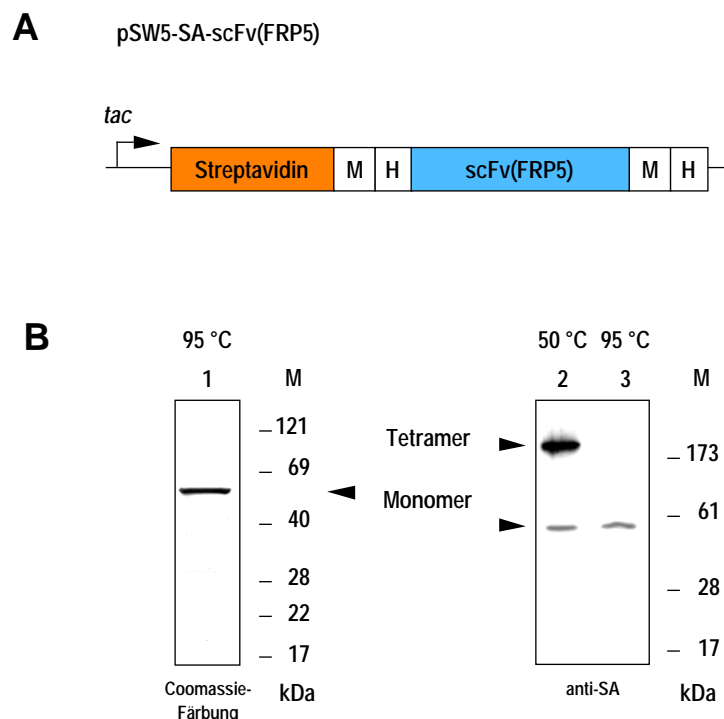


Abb. 2.2 | **Konstruktion und Expression des bispezifischen Trägerproteins SA-5. (A) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts zur Expression von SA-5 in *E. coli*.** Das Expressionsplasmid pSW5-SA-scFv(FRP5) kodiert für ein Protein, das aus core-Streptavidin (SA) und dem ErbB2 spezifischen scFv(FRP5) besteht. Myc- (M) und Hexahistidin-tag (H) dienen der immunologischen Detektion sowie der Proteinreinigung. **(B) Coomassie gefärbtes SDS Gel und Western blot von gereinigtem und renaturiertem SA-5.** SA-5 wurde in *E. coli* exprimiert, denaturiert, mittels Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt und renaturiert. Die Reinheit des Proteins wurde mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Spur 1). SA-5 wurde vor dem Laden auf das Gel für 10 min bei 50 °C (Spur 2) oder 95 °C (Spur 1+3) in Gegenwart von 1 % SDS und 5 % β -Mercaptoethanol inkubiert. Die Detektion im Western blot (Spur 2+3) erfolgte durch ein SA spezifisches Antiserum. Banden, die der monomeren bzw. tetrameren Form von SA-5 entsprechen, sind durch Pfeile markiert.

Gesamtzellextrakte von Expressionskulturen wurden denaturiert (8 M Harnstoff) und SA-5 wurde unter denaturierenden Bedingungen durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt. Nach Optimierung der

Expressionsbedingungen wurden etwa 50 mg gereinigtes Fusionsprotein pro Liter Expressionskultur erhalten (Daten nicht gezeigt), die zur Renaturierung eingesetzt wurden. Dazu wurde der Renaturierungsansatz auf eine Konzentration kleiner 10 $\mu\text{g/ml}$ verdünnt und wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben dialysiert (vgl. 2.2.15). Unter optimierten Renaturierungsbedingungen konnten etwa 1 mg SA-5 pro Liter Expressionskultur renaturiert werden. Die Reinheit des Fusionsprotein wurde durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung untersucht. Dabei wurde SA-5 in einer einzelnen Bande angefärbt (Abb. 2.2 B, Spur 1).

Um zu überprüfen, ob das SA-5 Fusionsprotein über die SA-Domäne tetramerisiert, wurde gereinigtes und renaturiertes SA-5 in Gegenwart von 1 % SDS und 5 % β -Mercaptoethanol für 10 min bei 50 °C bzw. bei 95 °C erhitzt, im SDS-Gel elektrophoretisch getrennt und im Western blot mit dem mAk 9E10 detektiert. Aufgrund der hohen Proteinstabilität liegt SA in Gegenwart von 1 % SDS bei Temperaturen unter 60 °C als tetrameres Protein vor (Bayer *et al.*, 1989).

In Abb. 2.2 B ist zu erkennen, daß SA-5, welches bei 50 °C inkubiert wurde, in einer Hauptbande bei 185 kDa detektierbar war und in einer schwächeren Bande bei etwa 50 kDa (Spur 2). Dies weist darauf hin, daß gereinigtes und renaturiertes SA-5 hauptsächlich in Form eines sehr stabilen tetrameren Proteins vorlag (berechnete Molekulargewichte: monomere Form: 47 kDa, tetramere Form: 188 kDa). Inkubation von SA-5 bei 95 °C hingegen führte zur kompletten Denaturierung des Fusionsproteins und so zur Dissoziation des Tetramers (Abb. 2.2 B, Spur 3). Die tetramere Natur von SA-5 unter nativen Bedingungen konnte auch mittels analytischer Gelfiltration mit einer zuvor geeichten Superose 6 Gelfiltrationssäule demonstriert werden. Hierbei eluierte das SA-5 Fusionsprotein in einem Hauptpeak, welcher einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa entsprach (Daten nicht gezeigt).

3.1.2 Charakterisierung der Bindungs- und Internalisierungseigenschaften von SA-5

Mit Hilfe der C-terminalen scFv(FRP5) Antikörperdomäne sollte das SA-5 Fusionsprotein spezifisch an ErbB2 auf der Oberfläche von Zellen binden können und durch rezeptorvermittelte Endocytose in diese aufgenommen werden. Dadurch sollte das Fusionsprotein auch die Aufnahme biotinylierter Proteine in Form von SA-5 Komplexen in das Zellinnere ermöglichen.

Die Funktionalität der scFv(FRP5) Domäne des SA-5 Fusionsproteins wurde in durchflußcytometrischen Studien (FACS) mit murinen Renca-lacZ/ErbB2 Nierenkarzinomzellen analysiert. Diese Zellen sind mit dem lacZ Gen und mit humaner *c-erbB2* cDNA transfiziert. ErbB2 wird von Renca-lacZ/ErbB2 in großen Mengen auf der Zelloberfläche exprimiert. Da der mAk FRP5 keine Affinität zu murinem ErbB2 besitzt, eignen sich Renca-lacZ/ErbB2 und parentale Renca-lacZ Zellen als Modellsystem für ErbB2 positive und ErbB2 negative, ansonsten jedoch isogene Tumorzellen zur Untersuchung ErbB2 spezifischer Wirkstoffe (Maurer-Gebhard *et al.*, 1999).

Außerdem wurde die Bindung von SA-5 an die Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 453 und MDA-MB 468 untersucht. MDA-MB 453 Zellen exprimieren viel ErbB2, wohingegen die Expression von ErbB2 in MDA-MB 468 Zellen nicht detektierbar ist (Hoffmann *et al.*, 1998). Die Zelllinien wurden

mit SA-5 inkubiert und gebundene Fusionsprotein wurden mit dem mAk 9E10 gefolgt von Phytoerythrin (PE)-markiertem anti-Maus IgG detektiert.

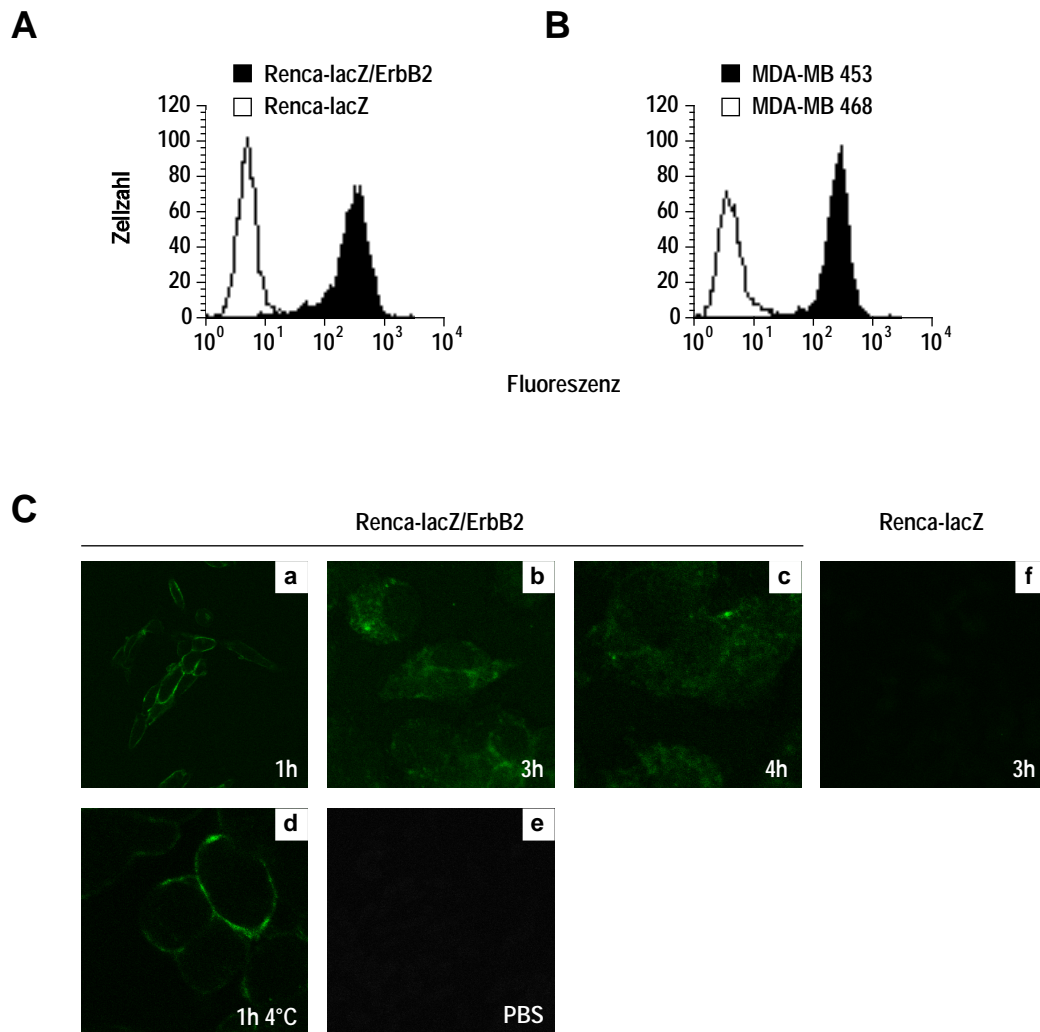


Abb. 2.3 | **Analyse der Bindungs- und Internalisierungseigenschaften von SA-5. (A+B) Bindung von SA-5 an ErbB2 auf der Oberfläche von Zellen.** Die murinen Nierenkarzinomzelllinien Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 (A) und die Mammarkarzinomzelllinien MDA-MB 453 und MDA-MB 468 (B) wurden in durchflußcytometrischen Studien verwendet, um die Bindung von SA-5 an ErbB2 auf der Zelloberfläche zu untersuchen. Gebundene Proteine wurden mit dem mAk 9E10 und PE-konjugiertem Zweitantikörper detektiert. **(C) Internalisierung von SA-5 in ErbB2 exprimierende Zellen.** Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und für 1 h bei 4 °C (d) oder bei 37 °C (a-c, f) mit SA-5 inkubiert. Zellen, die ohne Protein behandelt waren, dienten der Kontrolle (e). Die Zellen wurden gewaschen und für weitere 2 h (b+f) oder 3 h (c) bei 37 °C kultiviert. Die angegebenen Zeiten sind Gesamtinkubationszeiten. Nach diesen Zeiträumen wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert, und gebundenes oder internalisiertes SA-5 wurde mit dem mAk 9E10 und Alexa488-gekoppeltem Zweitantikörper detektiert. Die Analyse der Präparate erfolgte durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie.

Wie in Abb. 2.3 A+B dargestellt, band SA-5 selektiv an die ErbB2 exprimierenden Renca-lacZ/ErbB2 (A) und MDA-MB 453 (B) Zellen. Bindung an ErbB2 negative Renca-lacZ (A) und MDA-MB 468 (B) Zellen wurde hingegen nicht beobachtet. Fusionsproteine, die scFv(FRP5) als tumorzellspezifische

Bindungsdomäne enthalten, werden nach Bindung an ErbB2 durch rezeptorvermittelte Endocytose in ErbB2 exprimierende Zellen aufgenommen (Uherek *et al.*, 1998; Wels *et al.*, 2004). Um zu untersuchen, ob auch SA-5 in ErbB2 exprimierende Zellen aufgenommen wird, was eine Grundvoraussetzung für die Funktionalität eines solchen Trägerproteins ist, wurden Renca-lacZ/ErbB2 Zellen für 1 h mit SA-5 inkubiert, gewaschen und für weitere 2 bis 3 h bei 37 °C kultiviert (Abb. 2.3 C). Zur Analyse der Zellbindung wurden die Zellen für 1 h bei 4 °C in Gegenwart von SA-5 inkubiert (Abb. 2.3 C, Bild d). Die Zellen wurden nach den angegebenen Zeiträumen fixiert und permeabilisiert, und gebundenes bzw. aufgenommenes SA-5 wurde mit dem mAk 9E10 und Alexa488-konjugiertem anti-Maus IgG detektiert.

Wie in Abb. 2.3 C gezeigt, konnte SA-5 nach 3 h in ErbB2 exprimierenden Renca-lacZ/ErbB2 Zellen detektiert werden (Bild b). Oberflächenfärbung, wie nach Inkubation bei 4 °C (Bild d), war nach 3 h bei 37 °C nicht vorhanden, was auf eine vollständige Aufnahme von SA-5 in ErbB2 exprimierende Zellen hinweist. Eine Aufnahme in ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen wurde hingegen nicht detektiert (Abb. 3 C, Bild f).

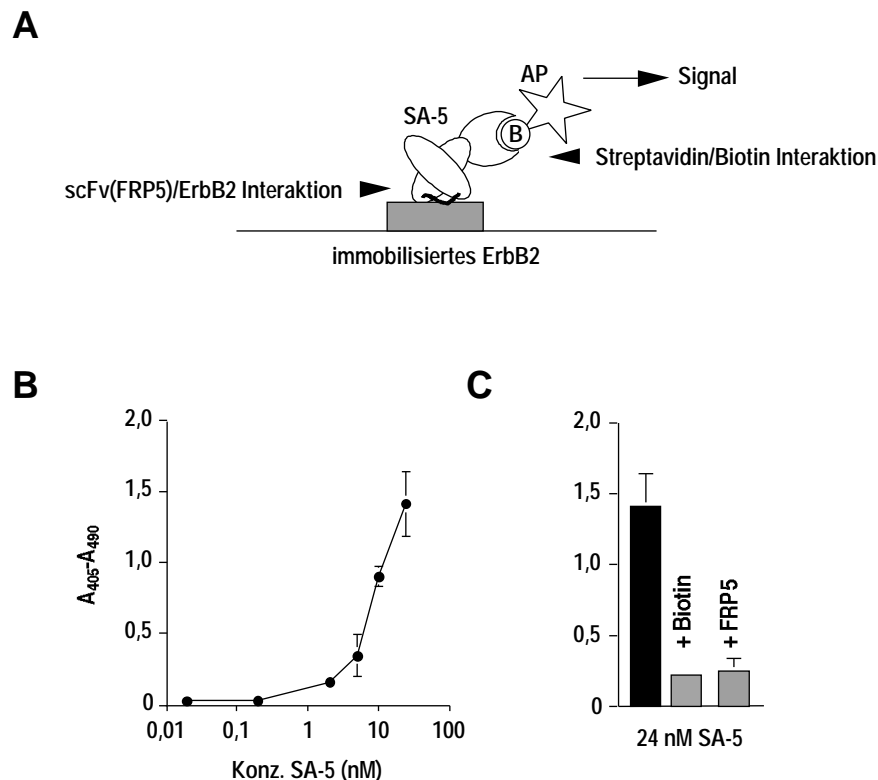


Abb. 2.4 | **Bindung von SA-5 an ErbB2 und Biotin.** (A) Schematische Darstellung des verwendeten Bindungstests. Die Bindungseigenschaften von SA-5 wurden in einem ELISA-ähnlichen Verfahren analysiert. Dazu wurde ErbB2₁₋₂₂₂, welches das Epitop des mAk FRP5 enthält, auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert und mit den in (B) angegebenen SA-5 Konzentrationen inkubiert. An ErbB2 gebundenes Fusionsprotein wurde mit einer Biotin-konjugierten Alkalischen Phosphatase (AP) detektiert (A-C). (C) Spezifität der Bindungen. Zur Analyse der Spezifität der Interaktionen wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt. Zur Konkurrenz der Bindung von SA-5 an ErbB2 wurde rekombinantes ErbB2₁₋₂₂₂ mit dem parentalen mAk FRP5 (24 nM) vorinkubiert. Zur Konkurrenz der Bindung von SA-5 an die biotinylierte AP wurde SA-5 mit Biotin vorinkubiert.

Neben der Affinität zu ErbB2 sollte SA-5 auch Spezifität für Biotin sowie für biotinylierte Proteine aufweisen. Um die simultane Bindung von SA-5 an ErbB2 und an Biotin zu untersuchen, wurde ein ELISA-ähnlicher Bindungstest etabliert. Dazu wurde ein N-terminales Fragment des humanen ErbB2 (ErbB2₁₋₂₂₂), welches das Epitop des mAk FRP5 enthält (Gerstmayer *et al.*, 1997), als rekombinantes Protein in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert, auf 96 well Platten immobilisiert und mit ansteigenden Konzentrationen an SA-5 inkubiert. An ErbB2 gebundenes Fusionsprotein wurde mit Hilfe einer Biotin-konjugierten Alkalischen Phosphatase (AP) und Messung ihrer enzymatischen Aktivität im NBT/BCIP System detektiert (Abb. 2.4). Die Daten des Bindungstests (Abb. 2.4 B) zeigen, daß SA-5 simultan an ErbB2 und an die biotinylierte AP binden kann und somit ein bispezifisches Protein darstellt. Zur Bestätigung der Spezifität der Bindungen wurde der mAK FRP5 verwendet, um die Bindung des SA-5 Fusionsproteins an ErbB2₁₋₂₂₂ zu kompetieren. Dazu wurde immobilisiertes ErbB2 mit FRP5 vorinkubiert. Zur Konkurrenz der Bindung von SA-5 an die biotinylierte AP wurde SA-5 mit Biotin vorinkubiert. Wie in Abb. 2.4 C gezeigt, konnte sowohl die Bindung von SA-5 an ErbB2 als auch die Bindung von SA-5 an die biotinylierte AP durch Vorinkubation mit den beiden Konkurrenten signifikant reduziert werden.

3.1.3 SA-5 vermittelte Aufnahme von bEGFP in ErbB2 exprimierende Zellen

Neben der spezifischen Bindung von SA-5 an ErbB2 auf der Zelloberfläche sowie der Bindung an biotinylierte Proteine war es wichtig zu untersuchen, ob SA-5 in der Lage ist, biotinylierte Proteine spezifisch in ErbB2 exprimierende Zellen einzuschleusen. Hierzu wurde eine biotinylierte Variante des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) eingesetzt (Abb. 2.5 A). Ein His-tag enthaltendes rekombinantes EGFP wurde in *E. coli* nach Transformation mit dem Expressionsplasmid pSW5-EGFP exprimiert, durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und renaturiert (Rohrbach, unveröffentlicht). Die Biotinylierung erfolgte mit Hilfe des Reagenz Sulfo-NHS-Biotin (Sulfosuccinimidobiotin, Pierce). Dieser Ester reagiert mit primären Aminen an exponierten Lysin-Seitenketten oder am N-Terminus von Polypeptidketten durch nukleophilen Angriff. Die nukleophilen Substitutionen führen zur kovalenten Amidbindung von Biotin-Molekülen an Proteine. Überschüssiges Reagenz wurde durch Dialyse gegen PBS sowie gegen Avidin enthaltendes PBS entfernt. Dieser Schritt erschien essentiell, da verbleibendes Sulfo-NHS-Biotin bei der späteren Kopplung des biotinylierten EGFP an SA-5 als Konkurrent fungieren würde.

Die durch SA-5 vermittelte Bindung von bEGFP an ErbB2 auf der Zelloberfläche von MDA-MB 453 Zellen wurde per Durchflußcytometrie analysiert. Dazu wurden die Zellen mit SA-5 und der biotinylierten oder der nicht-biotinylierten Variante des EGFP inkubiert. Gebundene Proteinkomplexe wurden durch Anregung und Messung der Fluoreszenz des EGFP detektiert. Wie in Abb. 2.5 B dargestellt, band die biotinylierte Variante des EGFP (bEGFP) vermittelt durch das SA-5 Fusionsprotein spezifisch an die Oberfläche der ErbB2 exprimierenden Zellen. Bei Verwendung der nicht-biotinylierten Variante des EGFP war keine Fluoreszenz auf der Zelloberfläche detektierbar (Abb. 2.5 B). Zur Kontrolle wurden auch ErbB2 negative MD-MB 468 Zellen mit SA-5/bEGFP Komplexen inkubiert. In diesem Fall

konnte keine Bindung detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Zur Analyse der SA-5 vermittelten Aufnahme von bEGFP in ErbB2 exprimierende Zellen wurden zunächst SA-5/bEGFP Komplexe durch Inkubation der beiden Proteinkomponenten im molaren Verhältnis von 1:8 hergestellt und anschließend Renca-lacZ/ErbB2 sowie Renca-lacZ Zellen mit diesen Komplexen behandelt. Dazu wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät, für 1 h mit SA-5/EGFP inkubiert, gewaschen und für weitere 2 h bei 37 °C kultiviert (Abb. 2.5 C, Bild b+c+e). Zur Analyse der Zellbindung wurden die Zellen für 1 h bei 4 °C in Gegenwart von SA-5/Komplexen inkubiert (Abb. 2.5 C, Bild a+d).

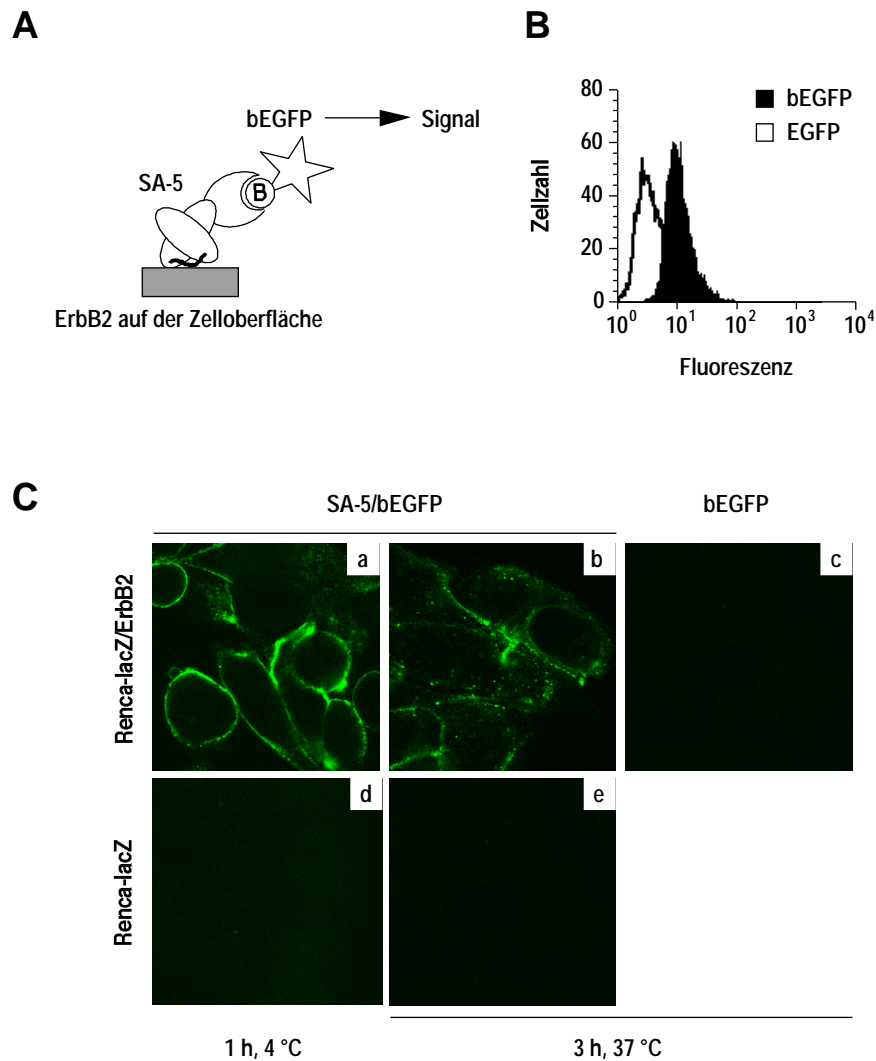


Abb. 2.5 | **Charakterisierung von SA-5/bEGFP-Komplexen.** Die grundsätzliche Fähigkeit von SA-5, als tumorspezifisches Trägerprotein für biotinylierte Proteine zu agieren, wurde mit Hilfe einer biotinylierten Variante des EGFP analysiert (**A**). (**B**) **Bindung von SA-5/bEGFP Komplexen an ErbB2 exprimierende Zellen.** MDA-MB 453 Zellen wurden mit SA-5 und der biotinylierten bzw. nicht-biotinylierten Variante des EGFP inkubiert, und die Fluoreszenz des gebundenen EGFP wurde durchflußcytometrisch gemessen. (**C**) **Zelluläre Aufnahme von SA-5/bEGFP Komplexen.** Renca-lacZ (d+e) und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen (a-c) wurden auf Objektträgern kultiviert und für 1 h bei 4 °C (a+d) oder bei 37 °C (b+c) in Gegenwart von SA-5/bEGFP Komplexen oder nur mit bEGFP (c) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für weitere 2 h bei 37 °C inkubiert (b+c+e). Die in der Abbildung angegebenen Zeiten sind Gesamtinkubationszeiten. Lokalisation von gebundenem oder internalisiertem EGFP wurde durch Detektion des EGFP mit Hilfe eines konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops analysiert.

Wie in Abb. 2.5 C, Bild b dargestellt, konnte bEGFP nach 3 h im Cytoplasma der ErbB2-exprimierenden Zellen detektiert werden. Dies weist darauf hin, daß SA-5/bEGFP Komplexe mit vergleichbarer Kinetik in Zellen aufgenommen wurden wie unkomplexiertes SA-5 Fusionsprotein (vgl. Abb. 2.3 C, Bild b). Eine Aufnahme von bEGFP ohne SA-5 vermittelte Bindung konnte dagegen ausgeschlossen werden, da Renca-lacZ/ErbB2 Zellen, die nur mit bEGFP inkubiert wurden, keine intrazelluläre Färbung zeigten (Abb. 2.5 C, Bild c). Bindung von SA-5/bEGFP Komplexen (Abb. 2.5 C, Bild d) an und Aufnahme (Abb. 2.5 C, Bild e) in ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen konnte nicht detektiert werden. Dies zeigt, daß die Aufnahme von SA-5/bEGFP Komplexen von der Präsenz des Zielrezeptors ErbB2 abhing.

3.1.4 Cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen

In den vorherigen Abschnitten wurde gezeigt, daß SA-5 ein bispezifisches tetrameres Protein ist, das Affinität zu ErbB2 sowie zu Biotin bzw. zu Biotin-konjugierten Proteinen besitzt. Das Fusionsprotein wird innerhalb von 3 h vollständig in ErbB2 exprimierende Zellen aufgenommen. Eine biotinylierte Variante des EGFP (bEGFP) konnte innerhalb des gleichen Zeitraumes durch Komplexierung mit SA-5 spezifisch in ErbB2 exprimierende Zellen eingeschleust werden.

Um zu prüfen, ob SA-5 verwendet werden kann, um solche biotinylierte Proteine in Zellen einzuschleusen, die im Inneren der Zelle einen cytotoxischen Effekt ausüben, wurde eine biotinylierte Variante von verkürztem *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETA42) hergestellt (Abb. 2.6 A).

Im Gegensatz zum vollständigen Exotoxin A, das aus drei funktionellen Domänen besteht, die für Zellbindung (Domäne I), Translokation aus dem Endosom ins Cytosol (Domäne II) sowie die cytotoxische Aktivität verantwortlich sind (Domäne III, katalytische Domäne), enthält die hier verwendete verkürzte ETA-Variante lediglich die Domänen II und III. Die Zellbindungsdomäne, die für die Bindung an den $\alpha 2$ -Makroglobulinrezeptor verantwortlich ist, fehlt in dem verwendeten Konstrukt. Die Wirkungsweise von Exotoxin A ist in Abschnitt 3.4.1 beschrieben. Fusionsproteine, die aus einem scFv Antikörper und dieser verkürzten Variante des Exotoxin A bestehen, zeigen hohe und selektive cytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen. In dieser Arbeit wurde biotinyliertes ETA42 verwendet (bETA42), um die zu erwartende cytotoxische Aktivität von SA-5, komplexiert mit biotinylierten Effektoren, anhand einer bereits etablierten toxischen Domäne zu untersuchen. Die Expression von ETA42 in *E. coli* wurde zuvor beschrieben (Zimmermann *et al.*, 1997), hier jedoch in leicht modifizierter Form durchgeführt. BL21-CodonPlus(DE3)-RIL, die mit dem Plasmid pSW202 transformiert waren, wurden in Expressionskulturen für 2 h bei 37 °C induziert. Die Bakterien wurden aufgeschlossen, ETA42 durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und renaturiert. Gereinigtes und renaturiertes ETA42 wurde durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 2.6 B). Die Biotinylierung von ETA42 erfolgte mit dem Reagenz Sulfo-NHS-Biotin und wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western blot überprüft. Hierbei konnte bETA42 mit einer SA-konjugierten Alkalischen Phosphatase detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die Affinität von nativem bETA42 zu SA wurde in einem Bindungstest mit SA beschichteten Mikrotiterplatten bestätigt.

Diese Bindung war mit Biotin kompetierbar (Daten nicht gezeigt).

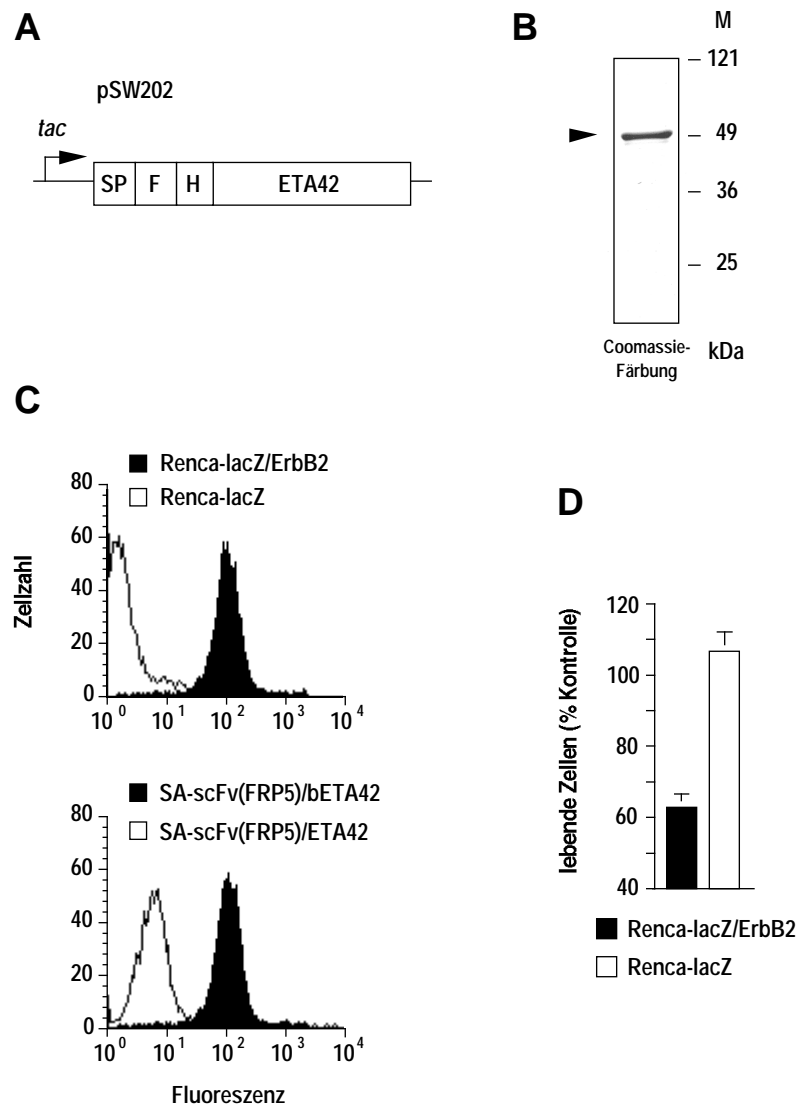


Abb. 2.6 | **Charakterisierung von SA-5/bETA42 Komplexen.** (A) **Expression von verkürztem Exotoxin A.** *P. aeruginosa* Exotoxin A wurde als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimiert. Hierzu wurde das bereits beschriebene Expressionskonstrukt pSW202 eingesetzt (Zimmermann *et al.*, 1997). Dieses bakterielle Expressionsplasmid kodiert für ein Protein bestehend aus dem N-terminalen *ompA* Periplasma-Sekretionssignal (SP), das Epitop des mAk M2 (FLAG-tag, F) und einen Hexahistidin-tag (H) fusioniert mit verkürztem Exotoxin A (Aminosäuren 252-613, ETA42). (B) **Coomassie gefärbtes SDS Gel von gereinigtem ETA42.** ETA42 wurde in *E. coli* exprimiert, denaturiert, durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt, renaturiert und biotinyliert. (C) **SA-5 vermittelte Bindung von bETA42 an ErbB2-exprimierende Zellen.** Renca-lacZ Zellen und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurden in FACS Experimenten verwendet, um die Bindung von SA-5/bETA42 Komplexen an ErbB2 auf der Zelloberfläche zu analysieren (oberes Histogramm). Gebundene Proteine wurden mit dem mAk M2 und PE-konjugiertem Zweitantikörper detektiert. Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurden mit SA-5 und der biotinylierten bzw. nicht-biotinylierten Variante des ETA42 inkubiert (unteres Diagramm). (D) **Cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen.** Die cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen gegenüber Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurde in MTT-Assays analysiert. Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und mit 5,3 nM SA-5 und 24 nM bETA42 inkubiert. Der Anteil überlebender Zellen wurde nach 48 h bestimmt.

Die Spezifität von SA-5/bETA42 Komplexen für ErbB2 wurde in durchflußcytometrischen Studien mit Renca-lacZ/ErbB2 als ErbB2 positive und Renca-lacZ als ErbB2 negative Zellen untersucht (Abb. 2.6 C). Zellgebundene Proteinkomplexe wurden mit dem mAk M2 und PE-konjugiertem Ziege anti-Maus IgG gefärbt. Hierbei konnte eine SA-5 vermittelte Bindung von bETA42 an ErbB2 exprimierende Renca-lacZ/ErbB2 Zellen beobachtet werden. Bindung an ErbB2 negative Renca-lacZ Zelle wurde dagegen nicht detektiert (Abb. 2.6 C, oberes Histogramm). Ebenso war keine SA-5 vermittelte Bindung des nicht biotinylierten Derivats von ETA42 an ErbB2 positive Zellen detektierbar (Abb. 2.6 C, unteres Histogramm). Diese Daten zeigen, daß die Bindung von bETA42 an ErbB2 exprimierende Zellen von SA-5 und der Präsenz des Zielrezeptors ErbB2 auf der Zelloberfläche sowie von der SA/Biotin Interaktion zwischen beiden Proteinen abhängt.

Die cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen wurde in MTT-Cytotoxizitätsassays untersucht (vgl. Abschnitt 2.2.23). Dazu wurden ErbB2 positive Renca-lacZ/ErbB2 und ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen in Gegenwart von SA-5/bETA42 Komplexen kultiviert. Die verwendeten Proteinkonzentrationen betrugen 5,3 nM SA-5 und 24 nM bETA42. Die Überlebensrate relativ zu unbehandelten Zellen wurde nach 48 Stunden durch Zugabe von MTT und Messung der Absorption bei 590 nm bestimmt. Wie in Abb. 2.6 C dargestellt, übten SA-5/bETA42 Komplexe einen selektiven cytotoxischen Effekt auf ErbB2 exprimierende Renca-lacZ/ErbB2 Zellen aus. ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen hingegen zeigen keine Sensitivität gegenüber den Proteinkomplexen.

Die selektive cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen läßt darauf schließen, daß die katalytische Domäne von bETA42 ihren Wirkort im Zellinneren erreicht hat. Im Cytosol von Zellen vermittelt die katalytische Domäne von Exotoxin A die ADP-Ribosylierung des Elongationsfaktors 2. Dies führt zur Inhibition der Proteinbiosynthese und so zur Induktion von Apoptose (Thorburn *et al.*, 2004). Die erhaltenen Ergebnisse weisen darauf hin, daß sowohl die Aufnahme von bETA42 in die Zielzelle, als auch die Translokation der katalytischen Domäne des Exotoxin A in das Cytosol stattgefunden hat. Die hohe cytotoxische Aktivität des ErbB2 spezifischen Fusionsproteins scFv(FRP5)-ETA (vgl. 1.5.3), welches einen IC_{50} Wert von 5-6 ng/ml (ca. 0,075 nM) gegenüber Renca-lacZ/ErbB2 Zellen aufweist (Azemar *et al.*, 2003), konnte mit SA-5/bETA42 Komplexen jedoch nicht erreicht werden. Dies bedeutet wahrscheinlich, daß die SA-5 vermittelte Aufnahme von bETA42 in ErbB2 exprimierende Zellen und die anschließende Translokation der katalytischen Domäne des ETA42 nur zu einem gewissen Anteil und nicht so effizient wie im Fusionsprotein erfolgt. Hierauf wird in der Diskussion weiter eingegangen.

3.1.5 Cytotoxische Aktivität von SA-5/bGrB Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen

Wie im Abschnitt 1.5.3 beschrieben, induzieren bakterielle Toxine wie Exotoxin A oder Diphtherietoxin durch Inhibition der Proteinbiosynthese auf indirekte Weise Apoptose. Dies führt letztendlich zur Aktivierung von Caspasen und zur Ausbildung des apoptotischen Phänotyps. Die Serinprotease GrB induziert Apoptose dagegen durch direkte Aktivierung von Caspasen. Um zu untersuchen, ob sich durch

Einschleusen von GrB in ErbB2 exprimierende Zellen direkt Apoptose auslösen läßt, wurde eine biotinylierte Variante dieses Enzyms abgeleitet.

Im Gegensatz zum zuvor verwendeten Exotoxin A enthält GrB jedoch keine Translokationsdomäne, die die Freisetzung des Enzyms vom endosomalen Kompartiment in das Cytosol bewirken kann. Sehr wahrscheinlich ist diese Translokation jedoch erforderlich, um GrB Zugang zu den zellulären Substraten zu verschaffen. Unter natürlichen Bedingungen wird GrB nach Freisetzung von cytotoxischen Lymphocyten und Aufnahme in Zielzellen mit Hilfe des porenbildenden Proteins Perforin in das Cytosol freigesetzt. Als Perforinersatz wurde in dieser Arbeit das endosomolytische Reagenz Chloroquin eingesetzt. Chloroquin akkumuliert im sauren Kompartiment der Zelle (späte Endosomen, Lysosomen) und stört hier als schwache Base das pH Gleichgewicht, woraus das osmotische Anschwellen dieses Kompartiments und schließlich der Kollaps der endosomalen Membran resultiert. Hierbei wird der Inhalt dieser Vesikel in das Cytosol freigesetzt (Cotten *et al.*, 1990; Zenke *et al.*, 1990).

Das in dieser Arbeit verwendete rekombinante GrB wurde von Dr. Ulrike Giesübel zur Verfügung gestellt (Giesübel, 2003). Die hier gezeigten Daten bezüglich der Expression und Reinigung dienen lediglich dem Verständnis der im folgenden beschriebenen Experimente zur Aufnahme von SA-5/bGrB Komplexen in ErbB2 exprimierende Zellen.

Die Expression des Enzyms erfolgte in der Hefe *Pichia pastoris*, die zur Herstellung großer Mengen an enzymatisch aktivem GrB geeignet ist (Giesübel, 2003). Das eingesetzte Expressionskonstrukt pPIC9-GrB ist in Abb. 2.7 A gezeigt. Das Protein wurde in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert, durch Ni^{2+} -Affinitätschromatographie aus Hefekulturüberständen gereinigt und gegen PBS dialysiert. (Details zum verwendeten Expressionskonstrukt, sowie zur Expression von GrB und GrB Fusionsproteinen sind in Abschnitt 3.2.1 beschrieben). Gereinigtes GrB wurde mit Sulfo-NHS-Biotin biotinyliert und anschließend gegen PBS sowie Avidin enthaltendem PBS dialysiert. Die Biotinylierung wurde mittels SDS-PAGE und anschließendem Western blot mit SA-konjugierter Alkalischer Phosphatase überprüft (Abb. 2.7 B, Spur 2+3). Nicht biotinyliertes GrB, das hier als Kontrollprotein eingesetzt wurde, konnte erwartungsgemäß nicht detektiert werden (Abb. 2.7 B, Spur 1). In der Hefe exprimiertes GrB ist enzymatisch aktiv und spaltet eine rekombinante Form der Procaspase-3 (Giesübel, 2003). Um zu prüfen, ob die Biotinylierung zu einem Verlust der enzymatischen Aktivität führte, wurde bGrB in einem Caspase-3 Spaltexperiment im Vergleich zu nicht-biotinyliertem GrB eingesetzt. Wie in Abb. 2.7 C gezeigt, sind beide Proteinpräparationen vergleichbar aktiv und führen bereits bei einer Konzentration von $1,25 \mu\text{g/ml}$ zur fast vollständigen Spaltung der Caspase-3 (Abb. 2.7 C, Spur 2 und 6). Daneben wurde untersucht, ob bGrB auch nach Bindung an SA weiterhin enzymatisch aktiv bleibt. Dazu wurde ein Bindungstest mit SA beschichteten Mikrotiterplatten durchgeführt. Die Platten wurden mit GrB bzw. bGrB inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt. Die Aktivität von gebundenem bGrB wurde durch Zugabe des colorimetrischen, GrB spezifischen Peptidsubstrats Ac-IETD-pNA und Messung der Farbentwicklung nachgewiesen (Abb. 2.7 D). Während GrB nicht an SA band, wurde bGrB durch Bindung an SA auf der Platte immobilisiert und führte so zur Spaltung des Peptidsubstrats.

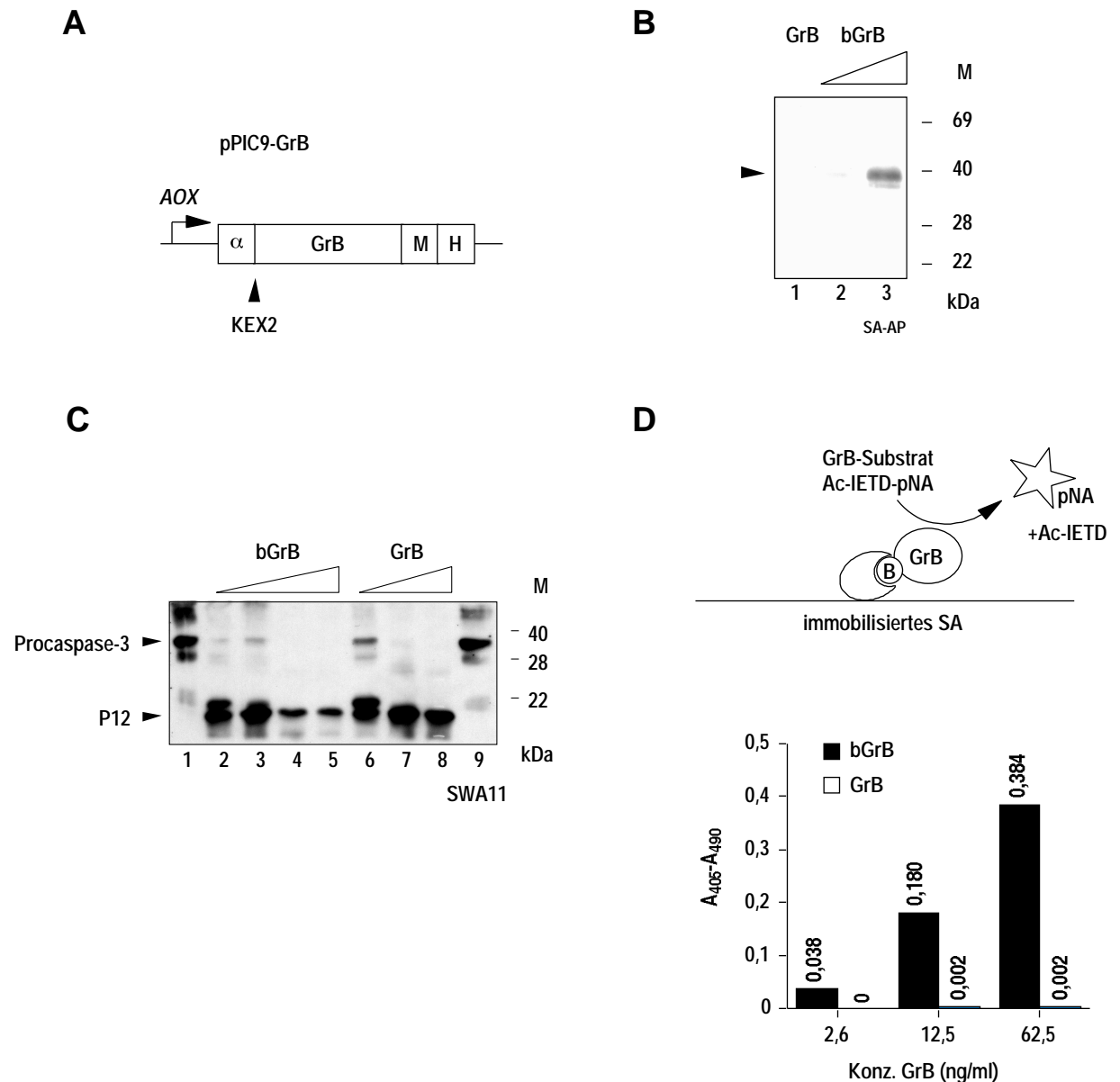


Abb. 2.7 | **Charakterisierung von biotinyliertem GrB.** (A) Schematische Darstellung des Expressionskonstrukts zur Expression von GrB in der Hefe *Pichia pastoris*. Der Vektor pPIC9-GrB kodiert für das α -Faktor Sekretionssignal fusioniert mit reifem GrB (AS 21-247). Während der Sekretion wird das Signalpeptid durch die *Pichia* Protease KEX2 abgespalten, wodurch der N-Terminus der reifen Protease entsteht (vgl. Abschnitt 3.2.1). (B) Analyse der Biotinylierung von bGrB. GrB und bGrB wurden im Western blot mit einer SA-konjugierten Alkalischen Phosphatase (SA-AP) detektiert. Auf das Gel wurden 500 ng nicht-biotinyliertes GrB (Spur 1) sowie 50 und 250 ng biotinyliertes GrB (bGrB; Spuren 2+3) aufgetragen. (C) Enzymatische Aktivität von bGrB. Rekombinante Procaspase-3 diente als Substrat zur Analyse der enzymatischen Aktivität von GrB und bGrB. Procaspase-3 wurde als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimiert (Giesübel, 2003). Am C-Terminus erlaubt ein Epitop-tag die immunologische Detektion mit mAk SWA11. Ansätze enthielten 2,5 μ g/ml Procaspase-3 und GrB oder bGrB in unterschiedlichen Konzentrationen (0,5, 5, 50, 250 ng bGrB in Spuren 2-5; 0,5, 5, 50 ng GrB in Spuren 6-8; Spuren 1, 9: Procaspase-3 ohne GrB). Die Ansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert und Prozessierung der Caspase-3 im Western blot mit dem mAk SWA11 analysiert. (D) Enzymatische Aktivität von bGrB nach Bindung an SA. SA-beschichtete Mikrotiterplatten wurden mit bGrB oder GrB inkubiert. Ungebundenes Protein wurde durch Waschen entfernt, und Peptidspaltungsreaktionen wurden durch Zugabe des colorimetrischen GrB spezifischen Peptidsubstrats Ac-IETD-pNA initiiert. Die Reaktionen wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert und durch Messung der Absorption bei 405 und 490 nm analysiert.

Zur Analyse der cytotoxischen Aktivität von SA-5/bGrB Komplexen wurden MTT-Assays durchgeführt. Die Fähigkeit dieser Komplexe, Apoptose zu induzieren, setzt die Aufnahme von GrB in den endosomalen Weg, sowie die Translokation aus diesem Kompartiment in das Cytosol voraus. Hier sollte dann die Spaltung und Aktivierung endogener Caspasen sowie die Spaltung anderer zellulärer Substrate zur Induktion von Apoptose führen. Um in Form von SA-5/bGrB Komplexen internalisiertem GrB den Zugang zum Cytosol zu ermöglichen, wurden Zellen mit SA-5/bGrB in Gegenwart des endosomolytischen Reagenz Chloroquin behandelt.

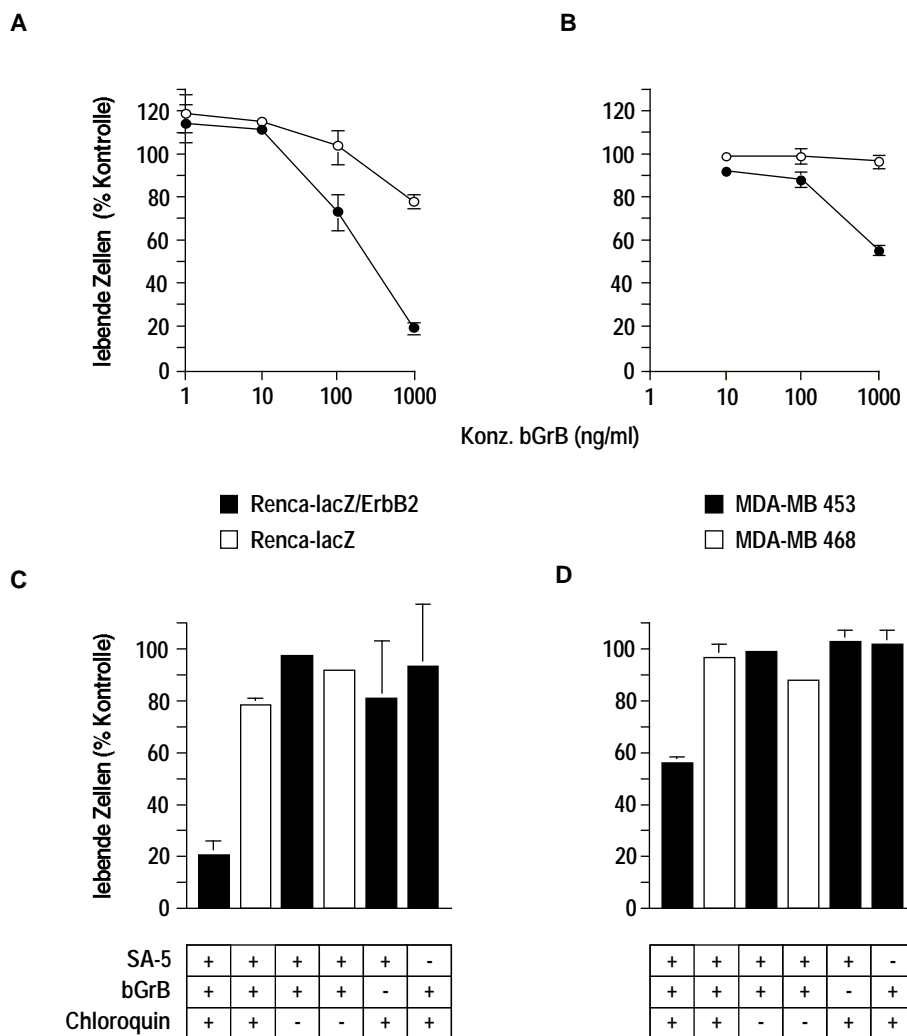


Abb. 2.8 | **Cytotoxische Aktivität von SA-5/bGrB Komplexen.** (A-D) MTT-Cytotoxizitätsassays. Die Zielzellen wurden mit 5,3 nM SA-5 und bGrB in den angegebenen Konzentrationen in Gegenwart von Chloroquin kultiviert. Nach 14 h wurde die Überlebensrate durch Zugabe von MTT bestimmt. (A) Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 wurden mit SA-5/bGrB Komplexen in Gegenwart von 100 μ M Chloroquin behandelt. (B) Die ErbB2 positiven bzw. negativen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 453 und MDA-MB 468 wurden in Gegenwart von SA-5/bGrB Komplexen und 50 μ M Chloroquin kultiviert. (C+D) Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen (C) oder MDA-MB 453 und MDA-MB 468 Zellen (D) wurden wie angegeben mit 5,3 nM SA-5 und 25 nM bGrB oder mit einer Kombination beider Proteine in Gegenwart oder Abwesenheit von Chloroquin behandelt.

Die cytotoxische Aktivität der Komplexe wurde gegenüber ErbB2 positiven Renca-lacZ/ErbB2 und

ErbB2 negativen Renca-lacZ Zellen sowie gegenüber ErbB2 positiven MDA-MB 453 und ErbB2 negativen MDA-MB 468 Mammakarzinomzellen untersucht. Die Zellen wurden mit den Proteinkomplexen in Gegenwart von Chloroquin für 14 h kultiviert, bevor die Überlebensrate analysiert wurde. Dabei wurde eine spezifische cytotoxische Aktivität der SA-5/bGrB Komplexe gegenüber ErbB2 exprimierenden Renca-lacZ/ErbB2 Zellen in Gegenwart von Chloroquin detektiert (Abb. 2.8 A).

Bei einer GrB Konzentration von 25 nM starben in Gegenwart von Chloroquin innerhalb von 14 h etwa 80 % der ErbB2 exprimierenden Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigte die ErbB2 negative Zelllinie Renca-lacZ nur geringe Sensitivität gegenüber den Proteinkomplexen (Abb. 2.8 A+C). Spezifische cytotoxische Aktivität der SA-5/bGrB Proteinkomplexe in Gegenwart von Chloroquin konnte auch gegenüber ErbB2 exprimierenden MDA-MB 453 Mammakarzinomzellen beobachtet werden, wohingegen ErbB2 negative MDA-MB 468 Zellen keine Sensitivität gegenüber diesen Proteinkomplexen zeigten (Abb. 2.8 B+D). Bei einer bGrB Konzentration von 25 nM, komplexiert mit 5,6 nM SA-5 starben 56 % der MDA-MB 453 Zellen (Abb. 2.8 D). Zellen, die entweder nur mit SA-5 (5,6 nM) oder nur mit bGrB (25 nM) kultiviert wurden, zeigten auch in Gegenwart von Chloroquin keine oder nur geringe Sensitivität (Abb. 2.8 C+D) gegenüber diesen Proteinen. Die cytotoxische Aktivität von SA-5/bGrB Proteinkomplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen war in allen Experimenten abhängig von der Präsenz des endosomolytischen Reagenz Chloroquin (Abb. 2.8 C+D).

3.1.6 Zusammenfassung der Abschnitte 3.1.1 bis 3.1.5

Im ersten Abschnitt dieser Arbeit wurde ein Fusionsprotein bestehend aus SA und dem ErbB2 spezifischen „single chain“-Antikörper scFv(FRP5) abgeleitet, in *E. coli* exprimiert und aus bakteriellen Lysaten in denaturierter Form gereinigt. Zur Renaturierung des Fusionsproteins in seine funktionale Konformation wurden geeignete Bedingungen etabliert. SA-5 erwies sich als bispezifisches, tetrameres Protein mit Affinität zu ErbB2 und Biotin bzw. Biotin-konjugierten Proteinen. Nach Bindung von SA-5 an ErbB2 auf der Zelloberfläche wurde das Fusionsprotein innerhalb von 3 h vollständig in das Cytoplasma aufgenommen. Im gleichen Zeitraum erfolgte auch die SA-5 vermittelte vollständige Aufnahme einer biotinylierten Variante des „enhanced green fluorescent protein“ (bEGFP). Eine biotinylierte Variante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (bETA42) konnte durch das SA-5 Trägerprotein selektiv in ErbB2 exprimierende Zellen eingeschleust werden und zeigte dort selektive cytotoxische Aktivität. Weiterhin wurde eine biotinylierte Variante der proapoptotischen Serinprotease GrB hergestellt (bGrB). bGrB erwies sich auch nach Biotinylierung und im SA gebundenem Zustand als enzymatisch aktiv. bGrB, das mit Hilfe des SA-5 Fusionsproteins in ErbB2 exprimierende Tumorzellen eingebracht wurde, induzierte selektiv den Zelltod in diesen Zellen. Die cytotoxische Aktivität von SA-5/bGrB Proteinkomplexen hing dabei von der Gegenwart des Zielrezeptors ErbB2 auf der Tumorzelloberfläche sowie von der Gegenwart des endosomolytischen Reagenz Chloroquin ab.

Die hier erhobenen Daten zeigen, daß biotinyliertes GrB, das in Form von SA-5 Komplexen in ErbB2 exprimierende Zellen aufgenommen wurde, eine vergleichbare cytotoxische Aktivität besitzt, wie

eine biotinylierte Variante des etablierten Effektors ETA42. Mit Hilfe des SA-5 Fusionsproteins und bGrB konnte so erstmals gezeigt werden, daß sich GrB verbunden mit einer Zellbindungsdomäne, die der Protease Spezifität für Tumorzellen verleiht, für den Einsatz als Effektor in Fusionsproteinen eignen könnte. Eine „endosome escape“ Funktion scheint dabei für die cytotoxische Aktivität erforderlich zu sein, da ohne Zusatz von Chloroquin kein Effekt der SA-5/bGrB Proteinkomplexe gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen beobachtet werden konnte. SA-5 könnte sich darüber hinaus auch generell als Trägerprotein zur Untersuchung neuer Effektoren für Antikörperfusionsproteine eignen, aber auch zum Einbringen beliebiger anderer biotinylierter Moleküle in ErbB2 exprimierende Zellen.

3.2 Chimäre GrB Fusionsproteine zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen

Der vorherige Abschnitt zeigt, daß das selektive Einschleusen einer biotinylierten enzymatisch aktiven Variante von GrB grundsätzlich für die Induktion von Apoptose in den untersuchten ErbB2 exprimierenden Tumorzellen ausreicht. Im folgendem Abschnitt dieser Arbeit ist die Konstruktion und funktionelle Charakterisierung von Fusionsproteinen beschrieben, die aus GrB und tumorzellspezifischen Zellbindungsdomänen bestehen.

3.2.1 Konstruktion, Expression und Reinigung chimärer GrB Fusionsproteine

Aufgrund ihres hohen cytotoxischen Potentials wird die Serinprotease GrB endogen als inaktives Prä-Proenzym synthetisiert (Trapani, 2001) (Abb. 2.10 A). Ein Signalpeptid leitet das Vorläuferprotein in das sekretorische Kompartiment der Zelle und bewirkt so die Speicherung von GrB in sekretorischen Vesikel. Bis zur Speicherung inhibiert das N-terminale inhibitorische Dipeptid (Gly-Glu) die enzymatische Aktivität von GrB. Durch die Dipeptidyl Peptidase I/Chatepsin C wird dieses Dipeptid entfernt, was schließlich zur Speicherung von reifem enzymatisch aktivem GrB führt. Die transiente Transfektion von COS-Zellen mit einem GrB Expressionskonstrukt, in dem das inhibitorische Dipeptid deletiert wurde, führte zur Expression von enzymatisch aktivem murinen (Caputo *et al.*, 1993) bzw. humanen (Smyth *et al.*, 1995) GrB. Dies deutet darauf hin, daß für die enzymatische Aktivität von GrB ein freier, definierter N-Terminus erforderlich ist, d. h. daß zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus zum Verlust der enzymatischen Aktivität führen könnten.

Um enzymatisch aktives GrB rekombinant herzustellen, wurden daher Plasmide zur Expression von GrB so konstruiert, daß nach Möglichkeit keine zusätzlichen Aminosäuren an den N-Terminus der reifen Protease angefügt bzw. während der Expression durch endogene Proteasen im herstellenden Organismus abgespalten wurden (Abb. 2.10 B). Die Expression und Reinigung von unmodifiziertem, enzymatisch aktivem GrB als rekombinantes Protein in der Hefe *Pichia pastoris* wurde ursprünglich von

Dr. Ulrike Giesübel etabliert (Giesübel, 2003).

Als eukaryotischer Organismus besitzt die Hefe *Pichia pastoris* viele Vorteile anderer eukaryotischer Expressionssysteme wie die Fähigkeit zur Prozessierung, Faltung und posttranslationalen Modifizierung (z. B. Glycosylierung) von Proteinen (Buckholz und Gleeson, 1991). Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten können in Hefen jedoch relativ große Mengen rekombinanter Proteine exprimiert werden [Übersicht: (Cereghino und Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000)]. *Pichia pastoris* ist ein methylotropher Organismus, der durch zwei Alkohol-Oxidasen (AOX) fähig ist, Methanol als alleinige Kohlenstoffquelle zu metabolisieren. Die Expression der Alkoholoxidase 1, für die das *aox1* Gen kodiert, wird durch Methanol induziert. Typischerweise stellt AOX1 über 30 % des gesamten löslichen Proteins in *Pichia pastoris* dar, wenn Methanol als Kohlenstoffquelle genutzt wird. Durch Rekombination eines Gens in den *aox1* Locus kann diese Hefe verwendet werden, um das Gen unter die Kontrolle des Methanol induzierbaren *aox1* Promotors zu stellen. In Anwesenheit von Glucose ist dieser Promotor vollständig reprimiert. Durch das Klonieren eines Gens in den Vektor pPIC9, der homologe Flanken des *aox1* Gens enthält, ist eine spezifische Insertion des Gens durch homologe Rekombination in den *aox1*-Locus möglich. Der Vektor pPIC9 enthält zusätzlich ein α -Faktor-Sekretionssignal, welches aus *Saccharomyces cerevisiae* stammt, und das Wildtyp *his4*-Gen von *Pichia pastoris*, welches für ein essentielles Enzym der Histidin-Biosynthese kodiert und als Selektionsmarker verwendet werden kann. Durch das α -Faktor-Sekretionssignal können rekombinante Proteine von *Pichia pastoris* ins Kulturmedium sekretiert werden, was einen Aufschluß der Hefezellen vor der Proteinreinigung unnötig macht. Da *Pichia pastoris* sehr wenige eigene Proteine sekretiert, stellt das rekombinante Protein den Hauptanteil an Protein im Kulturmedium dar. Glycosylierungs-Sequenzen werden darüber hinaus glycosyliert, im Gegensatz zu *Saccharomyces cerevisiae* findet jedoch keine Hyperglycosylierung statt, und das Glycosylierungsmuster ähnelt eher dem höherer Eukaryoten. Im Vergleich zu solchen aus *Saccharomyces cerevisiae* wirken glycosylierte Proteine aus *Pichia pastoris* daher nicht hyper-antigen im menschlichen Organismus, was für eine mögliche therapeutische Verwendung von Bedeutung ist (Romanos *et al.*, 1992).

Bei der homologen Rekombination von heterologen Genen in das Genom von *Pichia pastoris* können unterschiedliche Phänotypen entstehen. Durch ein einfaches „crossing over“ am *aox1*-Locus bleibt das endogene *aox1* Gen im Genom von *Pichia pastoris* intakt und befähigt die Hefe weiterhin, eine funktionelle Alkoholoxidase 1 zu exprimieren. Dieser Phänotyp wird als Mut⁺ (Methanol utalization plus) bezeichnet (Cregg *et al.*, 1993). Durch ein doppeltes „crossing over“ im *aox1* Locus wird das *aox1* Gen gegen das heterologe Gen ausgetauscht. Obwohl ein solcher Phänotyp keine funktionale AOX1 exprimieren kann, ist *Pichia pastoris* durch die AOX2 weiterhin in der Lage, Methanol zu metabolisieren. Das Wachstum solcher sogenannter Mut^s (Methanol utalization slow) Klone in methanolhaltigem Medium ist jedoch im Vergleich zu Mut⁺ Klonen deutlich langsamer. Mut⁺ Phänotypen können auch durch homologe Rekombination in den genomischen *his4*-Locus entstehen. In dem hier verwendeten Hefeexpressionssystem wurde eine im Histidin-Biosyntheseweg defekte Mutante GS115 verwendet, die nicht in der Lage ist, in histidinfreiem Kulturmedium zu wachsen. Da bei der homologen Rekombination

auch das Wildtyp *his4*-Gen in das Genom von *Pichia pastoris* inseriert wird, können korrekt transformierte Hefeklone durch die Fähigkeit, in histidinfreiem Medium zu wachsen, selektiert werden. Da der Vektor pPIC9 keinen in der Hefe aktiven Replikationsursprung besitzt, können die auf dem Vektor vorhandenen Gene nur durch Integration in das Hefegenom stabil in den Zellen vorliegen.

Zur Expression rekombinanter GrB Fusionsproteine in *Pichia pastoris* wurde das *Pichia* Expressionssystem der Firma Invitrogen verwendet. Als Ausgangspunkt diente hier ein pPIC9 Plasmid, in dem die cDNA von reifem GrB inseriert war (pPIC9-GrB) (Giesübel, 2003). Der Vektor pPIC9 erlaubt die Sekretion heterologer Proteine in das Kulturmedium. Das Signalpeptid, das für die Sekretion des überexprimierten Proteins verantwortlich ist, wird während der Ausschleusung in zwei Schritten abgespalten. Der erste Prozessierungsschritt erfolgt durch die *Pichia* Protease KEX2, die zur Furin-Familie gehört, in der Sequenz Glu-Lys-Arg*Glu-Ala-Glu-Ala (*: Spaltstelle). Das Tetrapeptid Glu-Ala-Glu-Ala wird anschließend durch eine weitere *Pichia* Protease STE13 entfernt. STE13 spaltet jedoch in einigen Fällen nur unzuverlässig, so daß das Glu-Ala-Glu-Ala Tetrapeptid am N-Terminus des rekombinanten Proteins verbleiben kann. Die Glu-Ala-Glu-Ala Sequenz ist aber offenbar nicht unbedingt für die erste Spaltung durch KEX2 erforderlich, und verschiedene Aminosäuren werden von KEX2 in Position P1' toleriert (Angaben des Herstellers des *Pichia* Expressionskits). Mit einem Konstrukt, in dem die cDNA von reifem GrB so in den Vektor pPIC9 inseriert ist, daß nach Spaltung des resultierenden Proteins allein durch KEX2 reifes GrB ohne eine zusätzliche Aminosäure am N-Terminus entsteht, konnte enzymatisch aktives GrB im mg Maßstab hergestellt werden (Giesübel, 2003).

Zur Expression von GrB Fusionsproteinen in der Hefe *Pichia pastoris* wurden daher Konstrukte hergestellt, die GrB in gleicher Art inseriert trugen. Um GrB zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen zu nutzen, wurde GrB in dieser Arbeit mit Zellbindungsdomänen fusioniert, die der Protease Spezifität für tumorassoziierte Antigene verleihen, um so die spezifische Aufnahme in diese Zellen zu erreichen. Als Zellbindungsdomänen wurden neben dem im Abschnitt 3.1 bereits beschriebenen ErbB2 spezifischen scFv(FRP5) Antikörperfragment auch der physiologische hochaffine Ligand des EGFR TGF α verwendet. Um die unabhängige Faltung beider funktioneller Domänen in den Fusionsproteinen zu gewährleisten, wurde ein strukturloser Glycin-Serin-Linker [(Gly₄-Ser)₄-His₆] zwischen GrB und Zellbindungsdomäne eingefügt.

Der schematische Aufbau der Expressionskonstrukte und die Vorgehensweise bei der Klonierung ist in Abb. 2.9 dargestellt. Sequenzen kodierend für scFv(FRP5) und für TGF α wurden aus den Plasmiden pWW152-scFv(FRP5) (Wels *et al.*, 1995) und pWW152-TGF α (Schmidt *et al.*, 1999) als *HindIII/XbaI* Fragmente erhalten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Plasmids pBIIKS-MH (Gerstmayer, 1997) eingesetzt. Dieses Plasmid trägt Sequenzen kodierend für das Epitop des mAk 9E10 sowie für einen Hexahistidin-tag zwischen den *XbaI* und *NotI* Restriktionsschnittstellen inseriert. An das 5' Ende der scFv(FRP5) bzw. TGF α cDNA wurde die Sequenz kodierend für den Glycin-Serin-Linker (Gly₄-Ser)₄-His₆ als hybridisiertes und geschnittenes doppelsträngiges Oligonukleotid aus GSH-sense und GSH-antisense in die *ClaI* und *HindIII* Schnittstellen eingesetzt. Die GrB

cDNA wurde per PCR mit den Oligonukleotidprimern 5' *Xho*I-DAEA-GrB und 3' *Cla*I-GrB amplifiziert. Das Plasmid pBIIKS-GrB (Giesübel, 2003) diente bei der Reaktion als Template. Das Amplifikat wurde mit *Xho*I und *Cla*I geschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen der zuvor beschriebenen Plasmide eingesetzt. Die resultierenden Plasmide pBIIKS-GrB-GSH-scFv(FRP5)-MH, und pBIIKS-GrB-GSH-TGF α -MH wurden mit *Xho*I und *Not*I verdaut, und die erhaltenen Fragmente wurden in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Expressionsvektors pPIC9 eingesetzt.

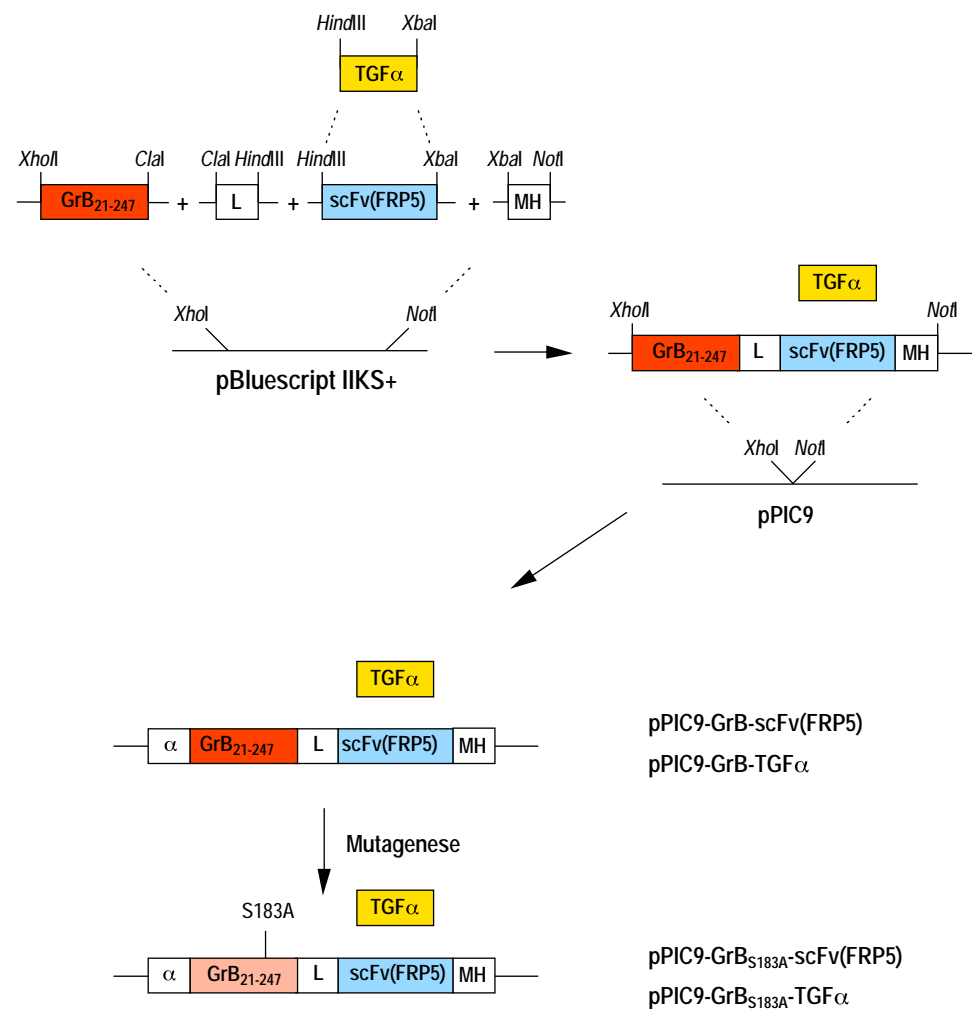


Abb. 2.9 | Schematische Darstellung der Herstellung der Plasmide pPIC9-GrB-scFv(FRP5), pPIC9-GrB-TGF α , pPIC9-GrB_{S183A}-scFv(FRP5) und pPIC9-GrB_{S183A}-TGF α . α : α -Faktor Signalpeptid von *Saccharomyces cerevisiae*; GrB: Sequenz des reifen humanen GrB (Aminosäuren 21-247); TGF α : Wachstumsfaktor TGF α ; scFv(FRP5): ErbB2 spezifisches Antikörperfragment; L: kodiert für (Gly₄Ser)₄His₆; M: kodiert für den Myc-tag; H: kodiert für einen Hexahistidin-tag

Als Negativkontrolle für die in diesem Abschnitt durchgeführten Experimente mit rekombinanten GrB Fusionsproteinen wurden enzymatisch inaktive Punktmutanten hergestellt. Da GrB eine Serinprotease ist, muß der Austausch des Serin im aktiven Zentrum zu einem vollständigen Aktivitätsverlust führen. Die aus dieser Modifikation resultierende Mutante GrB_{S183A} ist nicht mehr in der Lage, die Spaltung von

Peptidbindungen zu katalysieren (Caputo *et al.*, 1994; Giesübel, 2003). Die Mutagenese wurde mit Hilfe der beiden antiparallelen Primer GrB-S183A-sense und GrB-S183A-antisense in einer PCR durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, daß der für die Mutation notwendige „mismatch“ von mit der Matrize komplementären Bereichen umgeben war und das Plasmid vollständig amplifiziert wurde. Die Plasmide pBIIKS-GrB-GSH-scFv(FRP5)-MH bzw. pBIIKS-GrB-GSH-TGF α -MH wurden bei den Reaktionen als „template“ verwendet. Die so mutierten Konstrukte wurden per Sequenzierung verifiziert, mit *XhoI* und *NotI* verdaut und die erhaltenen Fragmente wie oben beschrieben in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von pPIC9 inseriert. Die Hefeexpressionsvektoren pPIC9-GrB-scFv(FRP5), pPIC9-GrB-TGF α , pPIC9-GrB_{S183A}-scFv(FRP5) und pPIC9-GrB_{S183A}-TGF α wurden linearisiert und in *Pichia pastoris* GS115 transformiert. *Pichia pastoris* Klone, die die cDNA der GrB Fusionskonstrukte durch homologe Rekombination stabil in das Genom integriert hatten, wurden mittels PCR- und Expressions-Analyse identifiziert (Daten nicht gezeigt). Expressionskulturen zur präparativen Isolation der GrB Fusionsproteinen wurden herangezogen, und rekombinante Proteine aus den Überständen dieser Kulturen wurden durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt (Abb. 2.10 C). Es konnten ca. 1 bis 2 mg Protein je Liter Expressionskultur isoliert werden. Die scFv(FRP5) bzw. TGF α GrB Fusionsproteine sind im Folgenden mit G-5 bzw. G-T bezeichnet. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung (Abb. 1.10 C, Spur 4-6; Daten für die katalytisch inaktiven Fusionsproteine nicht gezeigt) sowie im Western blot mit dem mAk 9E10 (Abb. 2.10 C, Spur 1-3; Daten für die katalytisch inaktiven Fusionsproteine nicht gezeigt) bzw. einem GrB spezifischen mAk (Daten nicht gezeigt) analysiert. Wie in COS-Zellen exprimiertes GrB (Caputo *et al.*, 1993) sind auch die in *Pichia* produzierten GrB Fusionsproteine glycosyliert. So führte die Deglycosylierung der gereinigten GrB Fusionsproteine durch N-Glycosidase F zu einer deutlichen Reduktion des Molekulargewichtes (Daten nicht gezeigt). Die apparenten sowie die theoretischen Molekulargewichte der GrB Fusionsproteine betragen (apparentes Molekulargewicht/theoretisches Molekulargewicht): GrB, GrB_{S183A} 38 kDa/27 kDa; GrB-T, GrB_{S183A}-T 40 kDa/36 kDa; GrB-5, GrB_{S183A}-5 70 kDa/58 kDa.

3.2.2 Enzymatische Aktivität chimärer GrB Fusionsproteine

Zur Analyse der enzymatischen Aktivität rekombinanter GrB Fusionsproteine wurde ein colorimetrisches Peptidsubstrat eingesetzt. Das Tetrapeptid Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-*p*-Nitroanilid (Ac-IETD-pNA) enthält die Erkennungssequenz von GrB. Proteolytische Spaltung dieses Substrates durch GrB führt zur Freisetzung der Farbgruppe (*p*-Nitroanilin) und so zu einer Gelbfärbung, die photometrisch quantifiziert werden kann.

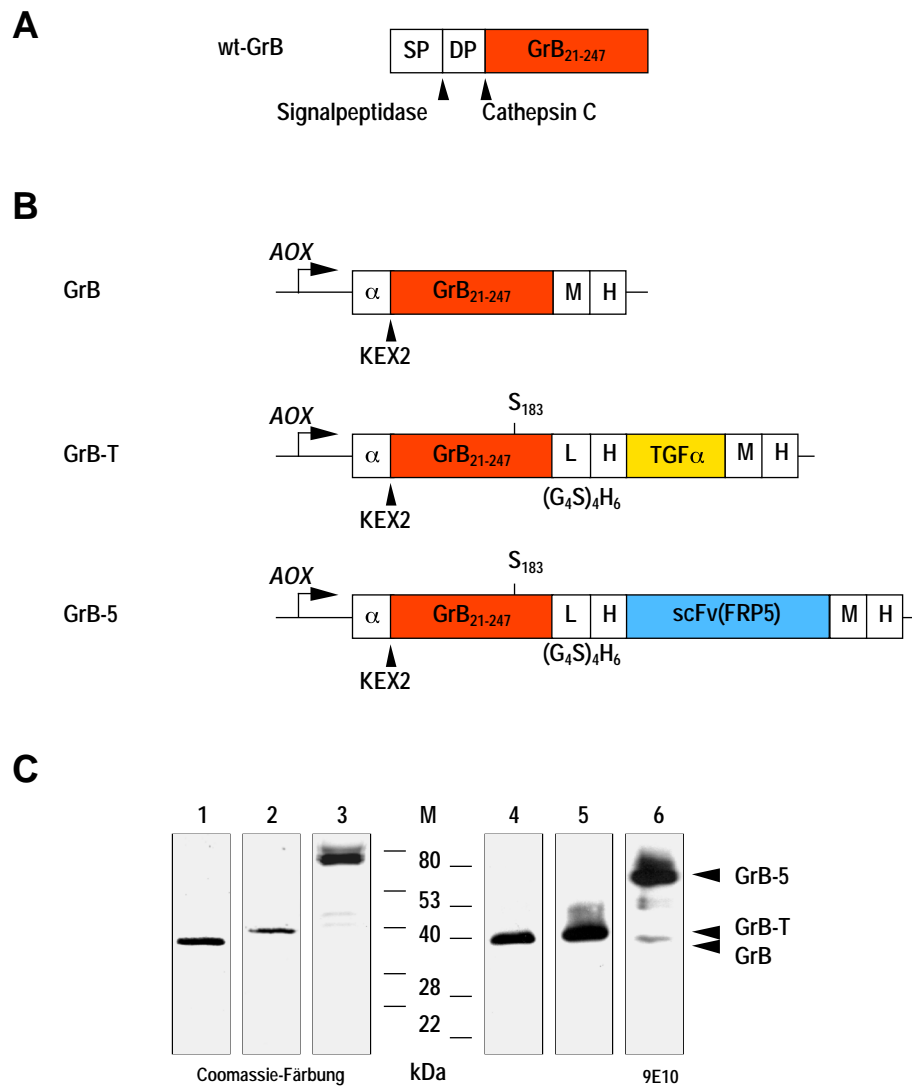


Abb. 2.10 | **Expression und Reinigung von GrB Fusionsproteinen.** (A) **Untereinheitenstruktur von Wildtyp GrB.** GrB wird als Prä-Proenzym synthetisiert, das aus einem Signalpeptid (Aminosäuren 1-18) für die Verpackung in sekretorische Vesikel und einem Aktivierungsdipeptid (Aminosäuren 19-20) besteht. Zwei proteolytische Spaltungen vermittelt durch Signalpeptidase und Chatepsin C führen zur Reifung des Prä-Proenzyms zur enzymatisch aktiven Protease. (B) **Schematische Darstellung der verwendeten Konstrukte zur Expression von GrB, GrB-5 und GrB-T.** Im Expressionsvektor pPIC9 ist die Sequenz von reifem GrB (Aminosäuren 21-247) mit dem α-Faktor Signalpeptid fusioniert, um die Sekretion der rekombinanten Proteine in den Kulturüberstand zu ermöglichen. Während der Sekretion wird das Signalpeptid durch die *Pichia* Protease KEX2 entfernt, woraus der N-Terminus von reifem GrB resultiert. Um der Protease Spezifität für Tumorzellen zu verleihen, wurde GrB C-terminal mit dem ErbB2 spezifischen scFv(FRP5) Antikörperfragment oder mit dem EGFR-Liganden TGFα fusioniert. In den Fusionsproteinen sind beide funktionelle Domänen durch eine Linkersequenz [L; (Gly₄Ser)₄His₆] voneinander getrennt. Am C-Terminus enthalten alle Konstrukte einen Myc-tag (M) und einen Hexahistidin-tag (H). (C) **Analyse der gereinigten GrB Fusionsproteine.** GrB-5 (Spur 3+6), GrB-T (Spur 2+5) und unfusioniertes GrB (Spur 1+4) wurden in *Pichia pastoris* exprimiert und durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Gereinigte Proteine wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Spur 1-3) bzw. im Western blot (Spur 4-6) mit dem mAk 9E10 analysiert.

Wie in Abb. 2.11 A dargestellt, spalteten die Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T das Peptidsubstrat mit vergleichbarer Aktivität wie nicht-fusioniertes rekombinantes GrB aus *Pichia pastoris*. Durch

Vorinkubation der Fusionsproteine mit dem GrB Peptidinhibitor Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-Aldehyd (Ac-IETD-CHO) konnte die enzymatische Aktivität erheblich reduziert werden, was die Spezifität der Spaltungsreaktion demonstriert. Die Punktmutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T zeigten in diesen Spaltungsreaktionen wie erwartet keinerlei enzymatische Aktivität (Abb. 2.11 B), was nachwies, daß die Substratspaltung von der enzymatischen Aktivität der GrB Domäne abhing und nicht durch eventuelle Verunreinigungen in den Proteinpräparationen hervorgerufen wurde.

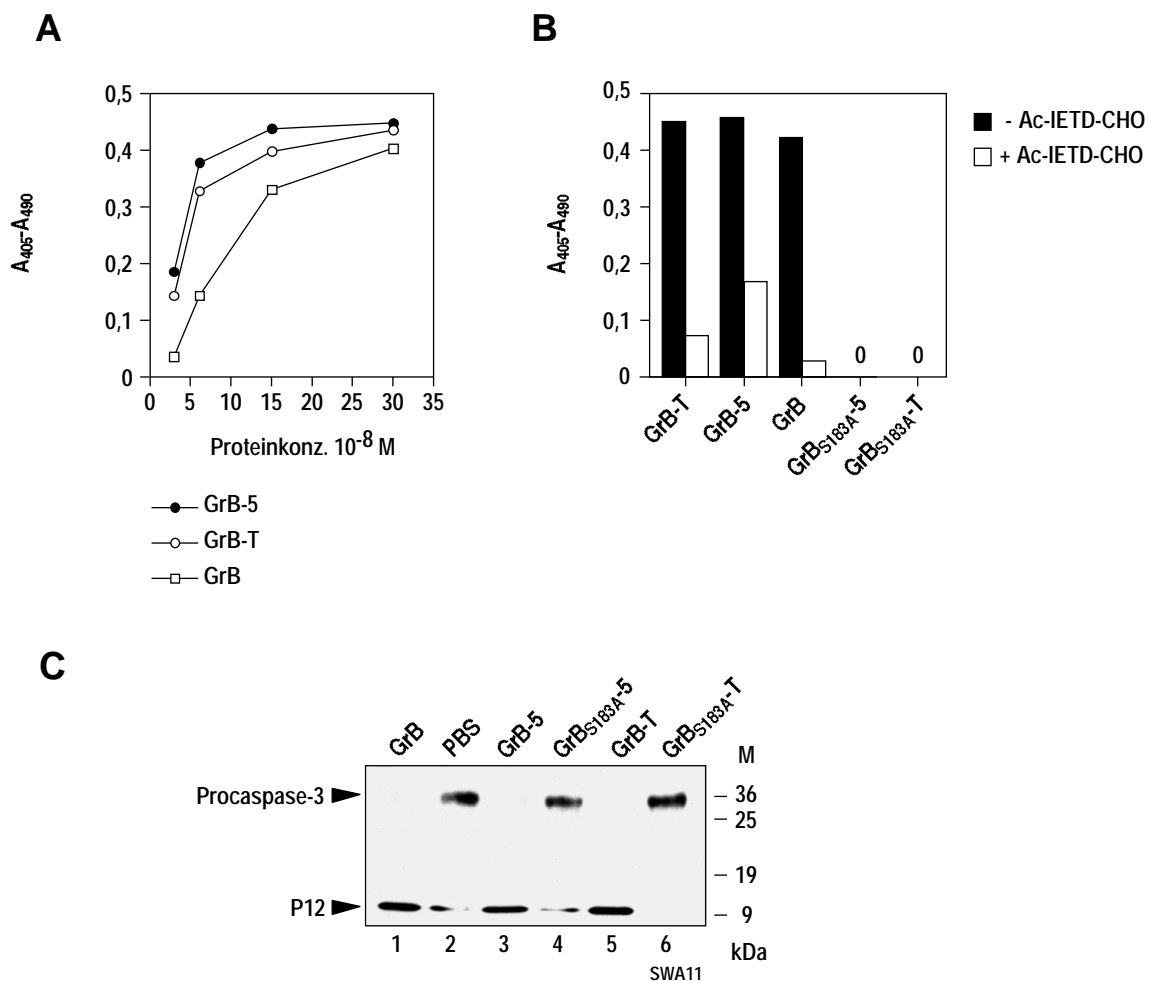


Abb. 2.11 | **Enzymatische Aktivität von GrB-5 und GrB-T. (A+B) Colorimetrische Peptidspaltungsassays.** *In vitro* Spaltreaktionen enthielten gereinigtes GrB, GrB-5 oder GrB-T in den angegebenen Konzentrationen und das colorimetrische GrB spezifische Peptidsubstrat Ac-IETD-pNA. Die Reaktionen wurden für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Farbentwicklung quantifiziert. **(B) Spezifität der Substratspaltung.** Die Spezifität der Substratspaltung wurde durch Zugabe von 400 µM des GrB Peptidinhibitors Ac-IETD-CHO oder durch Verwendung der GrB Mutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T, in denen das Serin im aktiven Zentrum durch ein Alanin ausgetauscht ist, untersucht. **(C) Spaltung von Procaspase-3.** Procaspase-3 wurde als natürliches Substrat verwendet, um die enzymatische Aktivität der GrB Fusionsproteine zu analysieren. Procaspase-3 wurde als rekombinantes Protein in *E. coli* exprimiert (Giesübel, 2003). Dieses Enzym enthält am C-Terminus das Epitop des mAk SWA11, was die immunologische Detektion des vollständigen Proteins (P32) sowie des P12 Spaltprodukts erlaubt. Die Reaktionen enthielten 200 ng Procaspase-3 und 200 ng der GrB Fusionsproteine und wurden über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Analyse der Substratspaltung erfolgte im Western blot mit dem mAk SWA11.

Zur weiteren Analyse der enzymatischen Aktivität der Fusionsproteine wurde Procaspase-3 als physiologisches Substrat von GrB eingesetzt. Procaspase-3 wurde als rekombinantes Protein mit einem C-terminalen SWA11-Epitop in *E. coli* exprimiert, gereinigt und renaturiert (Giesübel, 2003). Das rekombinante Protein wurde mit den GrB Fusionsproteinen inkubiert und die Reaktionsansätze wurden mittels SDS-PAGE und anschließend Western blot mit dem mAk SWA11 analysiert (Abb. 2.11 C).

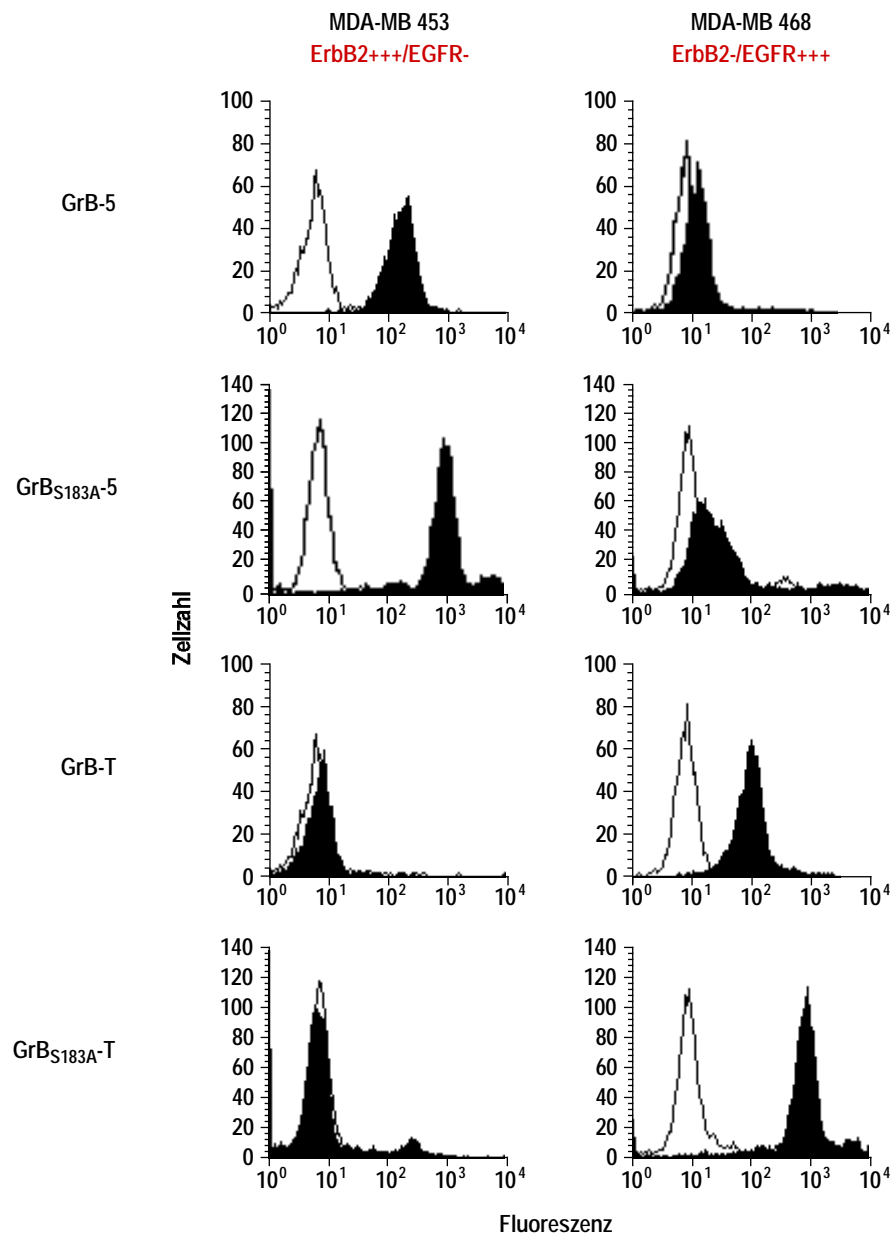


Abb. 2.12 | **Charakterisierung der Bindungseigenschaften von GrB-5 und GrB-T.** Die humanen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB 453 und MDA-MB 468 exprimieren große Mengen an ErbB2 und nicht nachweisbare Mengen an EGFR (MDA-MB 453) oder große Mengen an EGFR und nicht detektierbare Mengen an ErbB2 (MDA-MB 468). Die Zellbindung von GrB-5 und GrB-T sowie der inaktiven Enzymmutanten wurde in FACS Experimenten analysiert. Gebundene Proteine wurden mit dem mAk 9E10 und einem PE-konjugierten anti-Maus IgG detektiert.

Die verwendete Proteinpräparation der Procaspase-3 enthielt bereits einen geringen Anteil an P12 Unter-

einheit (Abb. 2.11 C, Spur 2). Inkubation mit den Fusionsproteinen GrB-5, GrB-T und mit unfusioniertem GrB führte jedoch zur vollständigen Prozessierung der Procaspase-3. Mit mAk SWA11 war nur noch das P12 Spaltprodukt der Caspase-3 detektierbar. Wie bereits in den Peptidspaltungsassays gezeigt, wurde Procaspase-3 dagegen nicht von den enzymatisch inaktiven Enzymmutanten GrB-5 und GrB-T gespalten (Abb. 2.11, Spur 4+6).

3.2.3 Charakterisierung der Bindungseigenschaften von GrB Fusionsproteinen

Die Fähigkeit von GrB-5 und GrB-T, an ihre Zielrezeptoren ErbB2 bzw. EGFR auf der Zelloberfläche zu binden, wurde in durchflußcytometrischen Studien untersucht (Abb. 2.12). Dazu wurden MDA-MB 453 und MDA-MB 468 Mammakarzinomzellen verwendet. MDA-MB 468 Zellen exprimieren große Mengen des EGFR auf der Zelloberfläche, wohingegen die Expression von ErbB2 nicht nachweisbar ist (Hoffmann *et al.*, 1998). Im Gegensatz hierzu exprimieren MDA-MB 453 Zellen viel ErbB2 und nicht detektierbare Mengen an EGFR (Hoffmann *et al.*, 1998). Da sich diese Zellen bezüglich ihrer Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche komplementär verhalten, eignen sie sich gut zur Untersuchung der Zellbindungseigenschaften der ErbB2 bzw. EGFR spezifischen Fusionsproteine.

Zellen beider Zelllinien wurden jeweils mit GrB-5 oder GrB-T inkubiert. An die Zelloberfläche gebundene Fusionsproteine wurden mit dem mAk 9E10 und PE gekoppeltem Zweitantikörper detektiert. Dabei konnte eine starke Bindung von GrB-5 an die ErbB2 exprimierenden MDA-MB 453 Zellen beobachtet werden, wohingegen nur eine sehr schwache Bindung an MDA-MB 468 Zellen detektiert wurde. Im Gegensatz hierzu band GrB-T an die EGFR positiven MDA-MB 468 Zellen, jedoch nicht an EGFR negative MDA-MB 453 Zellen. Die enzymatisch inaktiven Enzymmutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T zeigten in Bezug auf Bindung an ihre Zielrezeptoren keine Unterschiede zu den enzymatisch aktiven Varianten (Abb. 2.12).

Bindung von GrB-5 an ErbB2 auf der Zelloberfläche wurde auch mit der stabil transfizierten murinen Nierenkarzinomzelllinie Renca-lacZ/ErbB2 untersucht. Dabei wurde in durchflußcytometrischen Studien spezifische Bindung von GrB-5 an Renca-lacZ/ErbB2 Zellen beobachtet, jedoch nicht an parentale ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen (Abb. 2.13 A).

Die Spezifität der Bindung von GrB-5 an ErbB2 wurde in einem Kompetitionsexperiment bestätigt. Dabei wurde die Bindung des parentalen mAk FRP5 an Renca-lacZ/ErbB2 Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit GrB-5 kompetiert (Abb. 2.13 B+C).

Die spezifische Bindung von GrB-5 an ErbB2 wurde auch in einem ELISA-artigen Bindungstest bestätigt, in dem GrB-5 an immobilisiertes rekombinantes ErbB2₁₋₂₂₂ band. GrB diente in diesem Bindungstest als Kontrolle und wies wie erwartet keine Affinität zu ErbB2₁₋₂₂₂ auf.

In vorangegangenen Arbeiten von Dr. Ulrike Giesübel wurde gezeigt, daß rekombinantes GrB aus der Hefe *Pichia pastoris* an bisher nicht identifizierte Zielstrukturen auf Zelloberflächen bindet und schon nach Minuten in Zellen aufgenommen wird. Damit verhält sich rekombinantes GrB aus *Pichia pastoris* wie GrB aus cytotoxischen T-Lymphocyten (Giesübel, 2003). Die Zielstrukturen für diese „intrinsische

Bindung“ von GrB sind bisher nicht bekannt. Die in dieser Arbeit exprimierten GrB Fusionsproteine zeigten in den durchgeführten FACS Experimenten nur eine sehr schwache Bindung an ErbB2 bzw. EGFR negative Zellen (Abb. 2.12+2.13 A). Diese Bindung wurde vermutlich durch die intrinsische Bindung der GrB Domäne hervorgerufen. Die hochaffine Bindung an ErbB2 bzw. EGFR hingegen, die über die Zellbindungsdomänen in den Fusionsproteinen erfolgt, führte zu deutlich stärkeren Signalen in den durchgeführten FACS Experimenten.

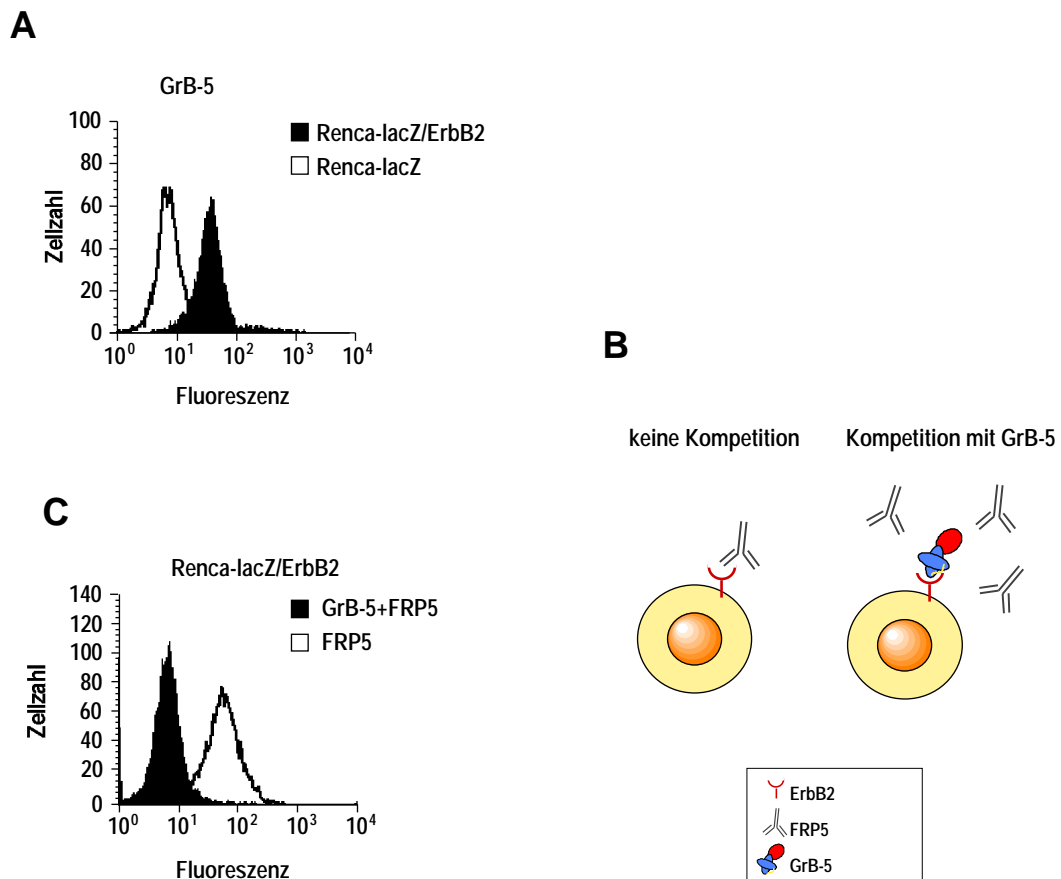


Abb. 2.13 | **Charakterisierung der Bindungseigenschaften von GrB-5. (A) Bindung von GrB-5 an Renca-lacZ Zellen.** Renca-lacZ Zellen sind murine Nierenkarzinomzellen, die mit dem lacZ Gen transfiziert sind. Renca-lacZ/ErbB2 Zellen sind zusätzlich mit humaner *c-erbB2* cDNA transfiziert und exprimieren diesen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Da murines ErbB2 von scFv(FRP5) nicht erkannt wird, stellen Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen ein Modellsystem für ErbB2 negative und ErbB2 positive Tumorzellen dar. In FACS Experimenten wurden Zellen beider Zelllinien mit GrB-5 inkubiert und gebundenes Protein mit dem mAk 9E10 und PE-konjugiertem anti-Maus IgG detektiert. **(B+C) Konkurrenzexperiment.** In einem FACS Experiment wurde die Bindung des parentalen mAk FRP5 an Renca-lacZ/ErbB2 Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit GrB-5 kompetiert. Gebundener mAk FRP5 wurde mit PE-konjugiertem anti-Maus IgG detektiert.

3.2.4 Cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T

Zur Analyse der cytotoxischen Aktivität der GrB Fusionsproteinen gegenüber etablierten Tumorzelllinien wurden MTT-Cytotoxizitätsassays durchgeführt (vgl. 2.2.23). Hierzu wurden EGFR stark exprimierende

MDA-MB 468 Zellen und EGFR negative MDA-MB 453 Zellen für 14 h mit unterschiedlichen GrB-T Konzentrationen inkubiert. Analog wurden ErbB2 positive Renca-lacZ/ErbB2 und ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen mit GrB-5 behandelt, um die cytotoxische Aktivität des ErbB2 spezifischen Fusionsproteins zu analysieren. Die Überlebensrate der Zellen, relativ zu Zellen die ohne Protein kultiviert wurden, wurde durch Zugabe von MTT und Messung der Absorption bei 590 nm bestimmt. Wie in Abb. 2.14 dargestellt, war keine Cytotoxizität der Fusionsproteine gegenüber EGFR bzw. ErbB2 positiven Zellen meßbar.

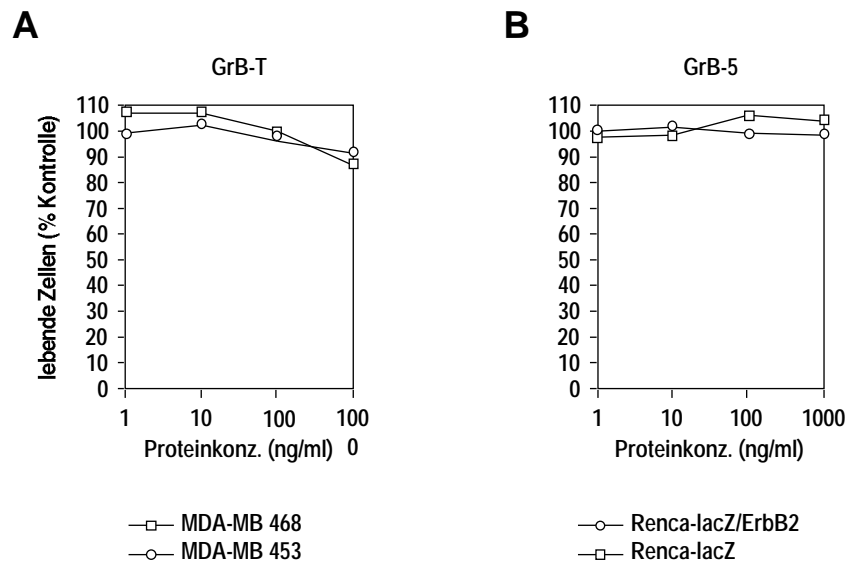


Abb. 2.14 | **Cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T.** Die Cytotoxizität von GrB-5 und GrB-T gegenüber EGFR bzw. ErbB2 positiven und negativen Zellen wurde in MTT-Cytotoxizitätsassays untersucht. Zellen wurden mit äquimolaren Mengen an GrB-5 oder GrB-T behandelt. Nach 14 h wurden der Anteil überlebender Zellen durch Zugabe von MTT bestimmt. **(A)** Cytotoxische Aktivität von GrB-T gegenüber EGFR positiven MDA-MB 468 und EGFR negativen MDA-MB 453 Zellen. **(B)** Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 wurden mit GrB-5 inkubiert.

Für die proapoptotische Aktivität von GrB ist die Spaltung intrazellulärer Substrate notwendig, die sich im Cytosol und im Zellkern befinden (Andrade *et al.*, 2004; Sarin *et al.*, 1997; Talanian *et al.*, 1997; Waterhouse *et al.*, 2005). Hierzu gehören Caspasen und Caspasen-Substrate (vgl. 1.4.3). Eine mögliche Ursache dafür, daß die GrB Fusionsproteine keine cytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen zeigten, könnte darin bestehen, daß die GrB Domäne dieser Proteine keinen Zugang zu ihren intrazellulären Substraten erlangt hat und so nicht als Apoptose induzierendes Protein wirken konnte. Wenn dies zutrifft, sollte eine direkte Injektion der Fusionsproteine in das Cytosol zur Induktion von Apoptose führen.

3.2.5 Cytotoxische Aktivität von cytosolischem GrB-5 nach Mikroinjektion

Um die cytotoxische Aktivität von cytosolischem GrB-5 zu analysieren, wurden Mikroinjektions-experimente durchgeführt, in denen GrB-5 (Abb. 2.15, Bild a+d) und enzymatisch inaktives GrB_{S183A}-5 (Abb. 2.15, Bild b+e) zusammen mit einem EGFP Fusionsprotein in das Cytosol von Renca-lacZ Zellen

injiziert wurden. Die Zellen wurden über Nacht kultiviert und am nächsten Tag mikroskopisch analysiert. Die Identifikation injizierter Zellen erfolgte dabei anhand der grünen Fluoreszenz (Bild a-c). Diese Zellen sind in den Phasenkontrastbildern mit Pfeilen markiert (Bild d-f).

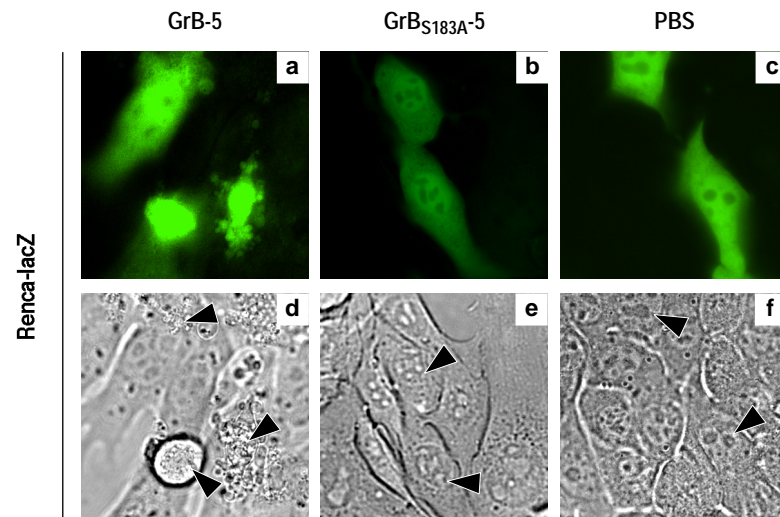


Abb. 2.15 | **Mikroinjektion von GrB-5 in das Cytosol von Renca-lacZ Zellen.** Zellen wurden mit GrB-5 (a+d) oder GrB_{S183A}-5 (b+e) jeweils in Kombination mit GST-EGFP (grüne Fluoreszenz) oder mit GST-EGFP allein injiziert (c+f). Nach 14 h erfolgte die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie. Dabei wurden injizierte Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert.

Wie in Abb. 2.15, Bild a+d dargestellt, zeigten Renca-lacZ Zellen, die mit GrB-5 injiziert waren, eine eindeutige apoptotische Morphologie. Injektion der enzymatisch inaktiven Mutante GrB-5 induzierte hingegen keine apoptotische Morphologie.

3.2.6 Intrazelluläre Lokalisation von GrB-5 und GrB-T

In Immunfluoreszenzfärbungen von A-431 Vulvakarzinomzellen, die mit GrB-5 bzw. GrB-T behandelt waren, wurde die intrazelluläre Lokalisation der Fusionsproteine analysiert. A-431 Zellen exprimieren beide Rezeptoren, EGFR und ErbB2 auf der Zelloberfläche (Schmidt und Wels, 2002). Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und für 1 h mit den GrB Fusionsproteinen inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden sie für weitere 1,5 h inkubiert, fixiert und permeabilisiert, und aufgenommene GrB Fusionsproteine wurden mit einem GrB spezifischen Antikörper und einem Alexa488 gekoppelten Zweitantikörper detektiert (grüne Fluoreszenz). Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid rot gefärbt. Durch konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie wurden die Präparate analysiert. Wie in Abb. 2.16 dargestellt, konnten beide GrB Fusionsproteine nach 2,5 h in den Zellen detektiert werden. Die GrB Fusionsproteine lagen jedoch nicht frei verteilt im Cytosol vor, sondern wurden als granuläre Strukturen im Cytoplasma behandelter Zellen angefärbt. Dies deutet darauf hin, daß GrB-5 und GrB-T nach der rezeptorvermittelten Aufnahme in membranumschlossenen Vesikeln lokali-

siert sind und daher keinen Zugang zu cytosolischen oder nukleären Substraten haben. Durch die Freisetzung der Fusionsproteine aus diesen Vesikeln sollte die GrB Domäne Zugang zu diesen Substraten erlangen, was analog zu den Mikroinjektionsexperimenten zur Induktion von Apoptose führen sollte.

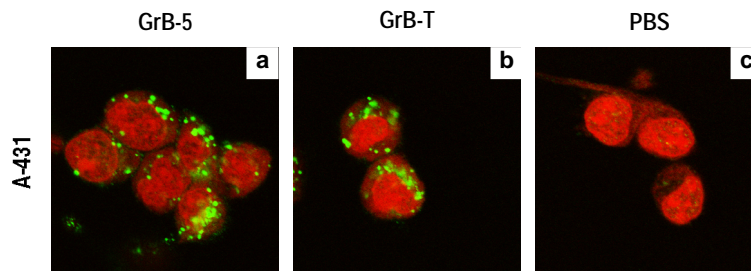


Abb. 2.16 | **Intrazelluläre Lokalisation von GrB-5 und GrB-T.** Die intrazelluläre Lokalisation der GrB Fusionsproteine in ErbB2 und EGFR positive humane A-431 Vulvakarzinomzellen wurde in Immunfluoreszenzanalysen untersucht. A-431 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und für 1 h mit 10 $\mu\text{g/ml}$ GrB-5 (Bild a) oder GrB-T (Bild b) inkubiert, gewaschen und für weitere 1,5 h kultiviert. GrB Fusionsproteine wurde nach dem Fixieren und Permeabilisieren mit einem GrB spezifischen Antikörper und Alexa488 gekoppeltem Zweitantikörper (grüne Fluoreszenz) im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop detektiert. Zelluläre Nukleinsäuren sind mit Propidiumiodid gefärbt (rote Fluoreszenz). Zellen, die ohne Protein inkubiert wurden, dienten als Kontrolle (Bild c).

3.2.7 Cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T nach cytosolischer Translokation

Um den GrB Fusionsproteinen nach der rezeptorvermittelten Aufnahme in Zielzellen den Zutritt zum cytosolischen Kompartiment zu ermöglichen, wurden Zellen mit GrB-5 bzw. GrB-T in Gegenwart des endosomolytischen Reagenz Chloroquin inkubiert. Chloroquin akkumuliert im sauren Kompartiment der Zelle (späte Endosomen, Lysosomen) und stört hier als schwache Base das pH Gleichgewicht, woraus das osmotisches Anschwellen dieses Kompartiments und schließlich der Kollaps der endosomalen Membran resultiert. Hierbei wird der Inhalt dieser Vesikel in das Cytosol freigesetzt (Cotten *et al.*, 1990; Zenke *et al.*, 1990).

In MTT-Assays wurde die cytotoxische Aktivität von GrB-T gegenüber EGFR überexprimierenden MDA-MB 468 Zellen und gegenüber EGFR negativen MDA-MB 453 Zellen untersucht. Der Anteil überlebender Zellen wurde nach 14 h durch Zugabe von MTT bestimmt. MDA-MB 468 Zellen wurden durch GrB-T in Gegenwart von Chloroquin mit einem IC_{50} Wert von 10 ng/ml (entspricht 0,25 nM) sehr effizient abgetötet (Abb. 2.17 A). Im Gegensatz hierzu zeigten MDA-MB 453 Zellen keine Sensitivität gegenüber GrB-T. Dies war auch bei hohen Proteinkonzentrationen von 1 $\mu\text{g/ml}$ in Gegenwart von Chloroquin der Fall (Abb. 2.17 A).

Zur Analyse der cytotoxischen Aktivität von GrB-5 wurden die zuvor beschriebenen Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 eingesetzt. ErbB2 positive Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurden in Gegenwart von Chloroquin effizient durch GrB-5 abgetötet. Der ermittelte IC_{50} Wert betrug 20 ng/ml (entspricht 0,29 nM). ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen waren nicht sensitiv gegenüber GrB-5 (Abb. 2.17 B).

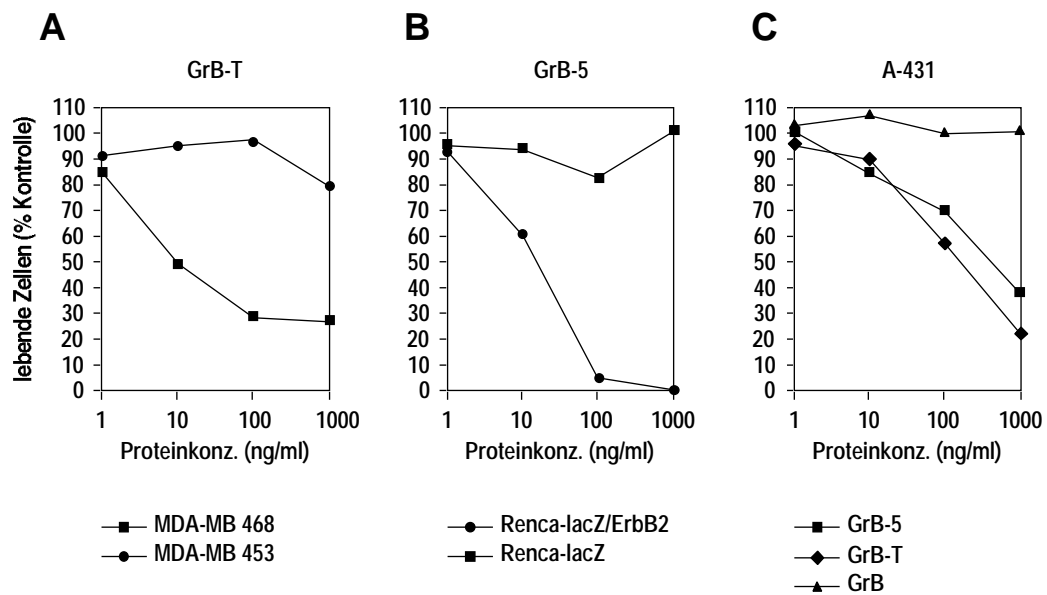


Abb. 2.17 | **Cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T in Gegenwart von Chloroquin.** Die Cytotoxizität von GrB-5 und GrB-T gegenüber Zielzellen und Nicht-Zielzellen wurde in MTT-Metabolisierungsassays untersucht. Zellen wurden mit äquimolaren Mengen an GrB-5, GrB-T oder GrB in Gegenwart von Chloroquin behandelt. Die eingesetzten ChloroquinKonzentrationen betrugen 50 μ M (A+B) oder 100 μ M (C). Nach 14 h wurde der Anteil überlebender Zellen durch Zugabe von MTT bestimmt. **(A) Cytotoxische Aktivität von GrB-T gegenüber EGFR positiven MDA-MB 468 und EGFR negativen MDA-MB 453 Zellen. (B) Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 wurden mit GrB-5 inkubiert. (C) Die cytotoxische Aktivität beider GrB Fusionsproteine gegenüber humanen A-431 Vulvakarzinomzellen, die beide Zielrezeptoren, ErbB2 und EGFR exprimieren wurde analysiert. Unfusioniertes GrB ohne Zellbindungsdomäne wurde als Kontrollprotein verwendet.**

Die cytotoxischen Aktivitäten von GrB-5 und GrB-T gegenüber Zielzellen in Gegenwart von Chloroquin sind vergleichbar mit denen der rekombinanten Immun- und Wachstumsfaktortoxine scFv(FRP5)-ETA (Maurer-Gebhard *et al.*, 1998; Wels *et al.*, 1992) und TGF α -ETA (Schmidt und Wels, 1996), die einen Effektor bakteriellen Ursprungs tragen.

Die Abhängigkeit der cytotoxischen Aktivität der GrB Fusionsproteine vom endosomolytischen Reagenz Chloroquin bestätigt, daß GrB-5 und GrB-T aus dem endosomal Kompartiment der Zelle freigesetzt werden müssen, um proapoptotisch aktiv zu sein. Die Spaltung und Aktivierung endogener Caspasen durch GrB-5 und GrB-T, die nach der Chloroquin vermittelten cytosolischen Translokation in Zielzellen erfolgt, ist in Abschnitt 3.2.10 beschrieben.

Die cytotoxische Aktivität der beiden Fusionsproteine wurde auch mit A-431 Vulvakarzinomzellen untersucht. Diese Zellen exprimieren beide Zielrezeptoren, ErbB2 und den EGFR (Schmidt und Wels, 2002). Wie erwartet wurden A-431 Zellen durch beide GrB Fusionsproteine in Gegenwart von Chloroquin abgetötet (Abb. 2.17 C). Unfusioniertes GrB ohne Zellbindungsdomäne hingegen, das in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt wurde, wies auch in Gegenwart von Chloroquin keine Cytotoxizität gegenüber A-431 Zellen auf, obwohl GrB intrinsische Zellbindungsaktivität besitzt und innerhalb kurzer Zeit in vesikulären Strukturen in das Cytoplasma von Zellen aufgenommen wird (Giesübel, 2003). Im Gegensatz zu GrB-5 und GrB-T kann GrB jedoch durch Chloroquin nicht aus diesen

Vesikeln freigesetzt werden, was bedeutet, daß unfusioniertes GrB in Zellen über einen anderen Weg aufgenommen wird als GrB-5 und GrB-T.

Diese Daten zeigen, daß eine Bindung der GrB Fusionsproteine über die Zellbindungsdomänen scFv(FRP5) bzw. TGF α notwendig ist für die cytotoxische Aktivität der Proteine.

3.2.8 Analyse der Spezifität der cytotoxischen Aktivität von GrB-5 und GrB-T

Um die Abhängigkeit der cytotoxischen Aktivität der GrB Fusionsproteine von den Zellbindungsdomänen scFv(FRP5) bzw. TGF α sowie von der katalytischen Aktivität der GrB Domäne weiter zu untersuchen, wurden Konkurrenzexperimente und Cytotoxizitätsassays mit den inaktiven Enzymmutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T durchgeführt (Abb. 2.18). Der Anteil überlebender Zellen wurde wie zuvor beschrieben in MTT-Assays bestimmt.

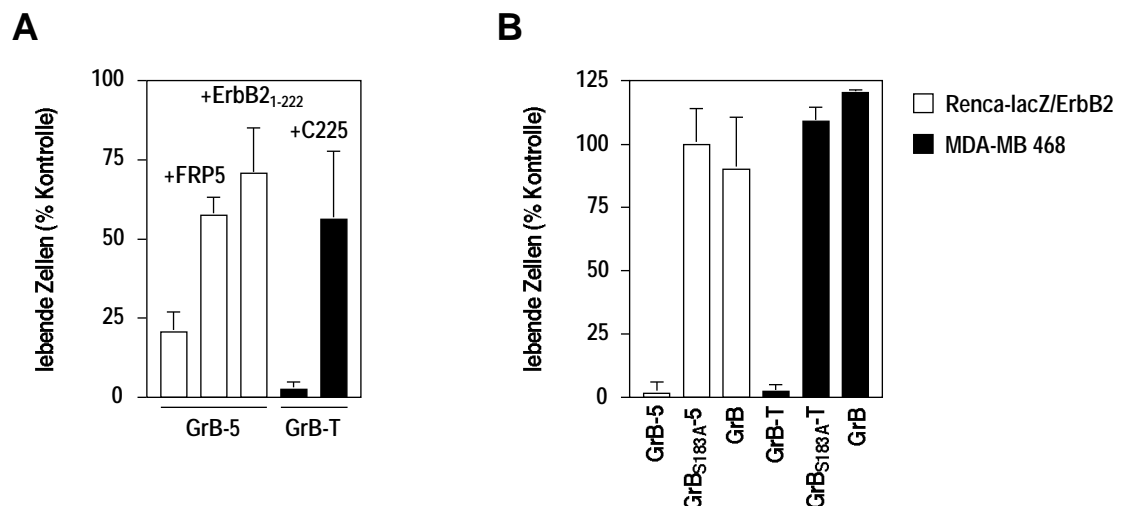


Abb. 2.18 | Abhängigkeit der cytotoxischen Aktivität von GrB-5 und GrB-T von Zellbindung und enzymatischer Aktivität. **(A) Cytotoxische Aktivität in Gegenwart von Kompetitoren der Zellbindung.** Um mit der Bindung des Fusionsproteins an den Zielrezeptor auf der Zelloberfläche zu kompetieren, wurde GrB-5 30 min vor der Zugabe zu Renca-lacZ/ErbB2 Zellen mit ErbB2₁₋₂₂₂ inkubiert. Alternativ wurden diese Zellen 30 min vor der Zugabe von GrB-5 mit dem parentalen mAk FRP5 inkubiert. MDA-MB 468 Zellen wurden 30 min vor der Zugabe von GrB-T mit dem antagonistischen EGFR spezifischen mAk C225 inkubiert. Die verwendeten Proteinkonzentrationen betrugen 75 ng/ml GrB-5, 100 ng/ml GrB-T. Die Kompetitoren wurden in molaren Überschüssen eingesetzt: ErbB2₁₋₂₂₂: 3,6facher Überschuß; FRP5: 77facher Überschuß; C225: 23facher Überschuß. **(B) Cytotoxizität in Abhängigkeit von der enzymatischen Aktivität.** Renca-lacZ/ErbB2 Zellen oder MDA-MB 468 Zellen wurden entweder mit 100 ng/ml GrB-5 oder 75 ng/ml GrB-T inkubiert. Äquimolare Mengen der inaktiven Enzymmutanten GrB_{S183A}-5 oder GrB_{S183A}-T und von nicht-fusioniertem GrB wurden als Kontrollen verwendet. **(A+B)** In allen Ansätzen wurden 50 μ M Chloroquin eingesetzt. Die Überlebensrate der Zellen wurde in MTT-Metabolisierungsassays nach 14 h gemessen.

Zur Konkurrenz der Zellbindung von GrB-5 an ErbB2 auf der Oberfläche von Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurde der parentale mAk FRP5 verwendet. Wie in Abb. 2.18 A dargestellt ist, konnte die cytotoxische Aktivität von GrB-5 gegenüber Renca-lacZ/ErbB2 Zellen durch Vorinkubation der Zellen mit FRP5

erheblich reduziert werden. Alternativ wurde rekombinantes ErbB2₁₋₂₂₂ zur Konkurrenz verwendet. ErbB2₁₋₂₂₂ enthält das Epitop des mAk FRP5. Vorinkubation von GrB-5 mit ErbB2₁₋₂₂₂ sollte daher zur Blockade des scFv(FRP5) führen. Wie in Abb. 2.18 A gezeigt ist, konnte auch durch ErbB2₁₋₂₂₂ die cytotoxische Aktivität von GrB-5 gegenüber Renca-lacZ/ErbB2 Zellen deutlich reduziert werden.

Die Bindung von GrB-T an MDA-MB 468 Zellen wurde durch Vorinkubation dieser Zellen mit dem EGFR spezifischen antagonistischen mAk C225 kompetiert, was zu einer reduzierten cytotoxischen Aktivität von GrB-T führte (Abb. 2.18 A). Unfusioniertes GrB, das keine Zellbindungsdomäne besitzt, zeigte, wie schon im Abschnitt 2.2.5 für A-431 Zellen dargestellt, auch gegenüber Renca-lacZ/ErbB2 Zellen und MDA-MB-468 Zellen keinen cytotoxischen Effekt in Gegenwart von Chloroquin. GrB wurde hier in äquimolaren Konzentrationen zu GrB-5 und GrB-T eingesetzt.

Zur Eliminierung von Tumorzellen durch GrB-5 und GrB-T ist neben der zellbindenden Aktivität auch die enzymatische Aktivität der GrB Domäne essentiell. Um dies zu bestätigen, wurden die Enzymmutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T verwendet. Für diese Proteine wurde zuvor gezeigt, daß sie enzymatisch inaktiv sind (Abb. 2.11 B+C), aber vergleichbare Bindungseigenschaften wie die enzymatisch aktiven Fusionsproteine besitzen (Abb. 2.13). Wie in Abb. 2.18 B dargestellt, weisen die enzymatisch inaktiven Varianten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T keine cytotoxische Aktivität gegenüber Renca-lacZ/ErbB2 bzw. MDA-MB-468 Zellen auf.

Zusammenfassend zeigen diese Daten, daß die Eliminierung von Tumorzellen durch GrB Fusionsproteine von der Präsenz des jeweiligen Zielrezeptors auf der Zelloberfläche sowie von der katalytischen Aktivität der GrB Domäne abhängt.

3.2.9 Induktion von Apoptose durch GrB Fusionsproteine

Neben der in den Metabolisierungsassays gemessenen hohen cytotoxischen Aktivität von GrB-5 und GrB-T zeigten Zielzellen, die mit diesen Fusionsproteinen behandelt wurden, auch deutliche morphologische Änderungen, die charakteristisch für apoptotische Zellen sind. Adhärenente Zellen kugelten sich ab und apoptotische Körperchen („apoptotic bodies“) schnürten sich von diesen Zellen ab („membrane blebbing“) (Abb. 2.19 A-C).

Das Auftreten dieser apoptotischen Zellmorphologie nach Behandlung mit GrB-5 bzw. GrB-T und Chloroquin war von der Präsenz des jeweiligen Zielrezeptors auf der Zelloberfläche abhängig. Während durch GrB-T keine morphologischen Änderungen von MDA-MB 453 Zellen hervorgerufen wurden (Abb. 2.19 A, Bild c), zeigten MDA-MB 468 Zellen eine eindeutige apoptotische Morphologie nach Behandlung mit GrB-T (Abb. 2.19 A, Bild a). Genauso konnten keine morphologischen Änderungen von Renca-lacZ Zellen nach Behandlung mit GrB-5 beobachtet werden (Abb. 2.19 B, Bild c), wohingegen Renca-lacZ/ErbB2 Zellen eine typische apoptotische Morphologie aufwiesen (Abb. 2.19 B, Bild a).

Das apoptotische Programm einer Zelle kann von der Induktions- bis zur Exekutionsphase sehr schnell ablaufen. In welchem Zeitraum eine Zelle diesen Prozeß von der Induktion bis zu auffälligen morphologischen Veränderungen durchmacht, hängt jedoch auch von der Aktivität des eingesetzten

Induktors ab. GrB greift am unteren Effektorende der apoptotischen Signalwege ein und umgeht damit die meisten regulatorischen Mechanismen. Durch GrB aktivierte Caspasen sind Teil einer Kaskade, die eine Verstärkung apoptotischer Signale bewirkt (vgl. 1.2.1). Aus diesem Grunde ist bei Verwendung von GrB Fusionsproteinen eine sehr schnelle Induktion von Apoptose in Zielzellen zu erwarten.

Durch GrB-5 induziertes Abschnüren apoptotischer Körperchen in Renca-lacZ/ErbB2 Zellen konnte bereits zwei Stunden nach Zugabe des GrB Fusionsproteins beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Nach drei Stunden wies nahezu jede der behandelten Zellen die apoptotische Morphologie im Endstadium auf. In Abb. 2.19 B, Bild e ist eine repräsentative Zelle mit charakteristischer Morphologie gezeigt, die für 3 h mit GrB-5 in Gegenwart von Chloroquin inkubiert wurde. Im Gegensatz hierzu zeigten ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen keine morphologischen Veränderungen in Gegenwart von GrB-5 (Abb. 2.19 B, Bild f).

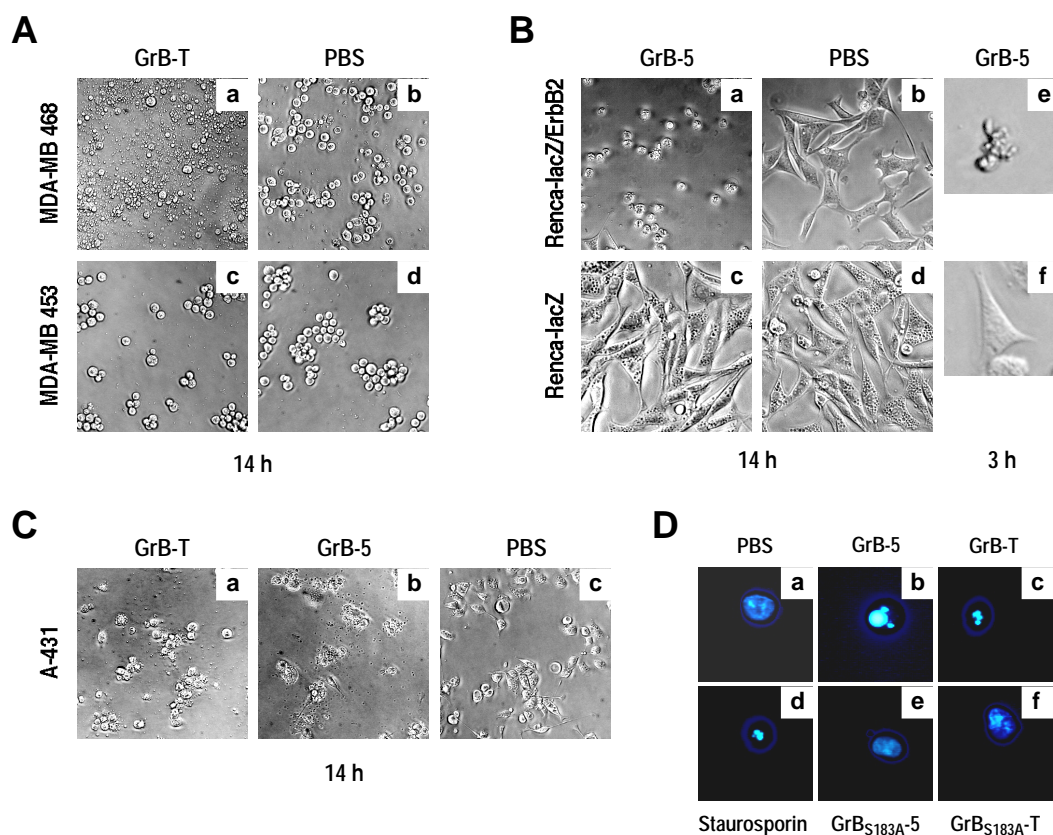


Abb. 2.19 | **Durch GrB-5 und GrB-T induzierte apoptotische Morphologie in Zielzellen.** (A) MDA-MB 453 und MDA-MB 468 Zellen wurden mit 100 ng/ml GrB-T oder PBS in Gegenwart von 50 μ M Chloroquin inkubiert. (B) Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen in Gegenwart von 100 ng/ml GrB-5 oder PBS und 50 μ M Chloroquin. (C) A-431 Zellen wurden mit 1 μ g/ml GrB-5 oder äquimolaren Mengen an GrB-T (0,5 μ g/ml) in Gegenwart von 100 μ M Chloroquin kultiviert. Die Zellmorphologie wurde nach 14 h analysiert. Die Morphologie von Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 nach drei Stunden in Gegenwart von 1 μ g/ml GrB-5 ist in Bild e+f gezeigt. (D) **Analyse der Kernmorphologie.** A-431 Zellen wurden mit PBS, 1 μ g/ml GrB-5, 1 μ g/ml GrB_{S183A}-5, 0,5 μ g/ml GrB-T oder 0,5 μ g/ml GrB_{S183A}-T und 100 μ M Chloroquin für 14 h inkubiert. Als Positivkontrolle wurde Apoptose durch 1 μ M Staurosporin induziert (Bild d). Die Zellkerne wurden mit dem zellpermeablen Farbstoff Hoechst 33342 gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die hier beobachtete Kinetik der Apoptoseinduktion ist vergleichbar mit der für das GrB/Perforin System beschriebenen. In Übereinstimmung mit Daten der Cytotoxizitätsassays (Abb. 2.17 C) wurde in A-431 Zellen, die beide Rezeptoren ErbB2 und EGFR exprimieren, durch beide Fusionsproteine GrB-T und GrB-5 apoptotische Morphologie induziert (Abb. 2.19 C, Bild a+b).

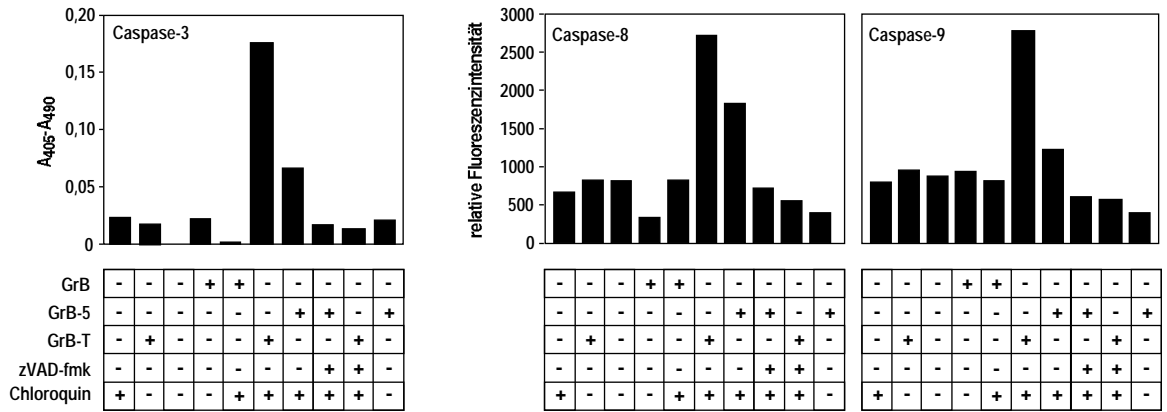
Neben dem Abschnüren apoptotischer Körperchen ist die Kondensation der genomischen DNA ein weiteres Charakteristikum apoptotischer Zellen. Die Spaltung des Inhibitors ICAD der „Caspase activated DNase“ (CAD) durch GrB oder durch Caspase-3 führt zur Freisetzung der aktiven DNase CAD und deren Import in den Zellkern, wo sie für die internukleosomale Fragmentierung der chromosomalen DNA („DNA laddering“) verantwortlich ist (Enari *et al.*, 1998). Diese Spaltung der genomischen DNA sowie die Spaltung der Kernlamina führen zur Chromatinkondensation, die ein auffälliges Merkmal der Reorganisation zellulärer Strukturen in apoptotischen Zellen darstellt. Durch Anfärben der genomischen DNA mit dem zellpermeablen und DNA-bindenden Farbstoff Hoechst 33342 wurde die Morphologie der Zellkerne von Zellen untersucht, die mit GrB Fusionsproteinen behandelt waren (Abb. 2.19 D).

In A-431 Zellen, die entweder mit GrB-5 oder GrB-T in Gegenwart von Chloroquin behandelt wurden, konnte Kondensation des Chromatins beobachtet werden (Abb. 2.19 D, Bild b+c). Im Gegensatz hierzu wurde durch die enzymatisch inaktiven Enzymmutanten GrB_{S183A}-5 und GrB_{S183A}-T in Gegenwart von Chloroquin keine Kondensation des Chromatins hervorgerufen (Abb. 2.19 D, Bild e+f). In Übereinstimmung mit den zuvor gezeigten Daten war die Änderungen der Kernmorphologie eine Folge der enzymatischen Aktivität der GrB Domäne.

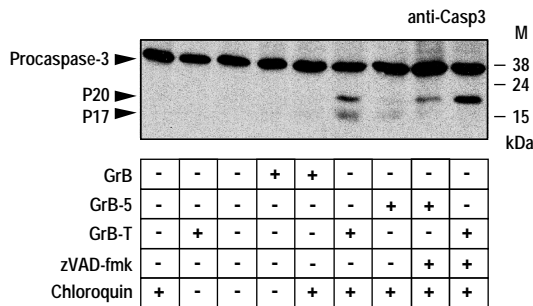
3.2.10 Aktivierung von endogener Caspase-3 durch GrB-T und GrB-5

Obwohl die exakte Abfolge der molekularen Änderungen, die GrB in Zielzellen hervorruft und die letztendlich zur Induktion von Apoptose führen, kontrovers diskutiert wird, ist es allgemein anerkannt, daß GrB im Cytosol der Zielzelle Caspasen spaltet und diese so aktiviert. Besonders der direkten Spaltung und Aktivierung von Caspase-3 durch GrB muß eine große Bedeutung für die schnelle Induktion von Apoptose beigemessen werden (Atkinson *et al.*, 1998). Um zu untersuchen, ob die hier konstruierten GrB Fusionsproteine endogene Caspase-3 in A-431 Zellen direkt aktivieren, wurden A-431 Zellen mit GrB-5 bzw. GrB-T in Gegenwart oder Abwesenheit von Chloroquin inkubiert. Nach 14 h wurden Zellysate dieser Zellen auf Spaltung und Aktivierung von Caspase-3, Caspase-8 und Caspase-9 untersucht. Die enzymatische Aktivität endogener Caspasen wurde mit dem colorimetrischen Caspase-3 Peptidsubstrat Ac-DEVD-pNA oder den fluorimetrischen Peptidsubstraten Ac-IETD-AFC und Ac-LEHD-AFC gemessen, welche bevorzugt von Caspase-8 und Caspase-9 gespalten werden. Um die gegenseitige Aktivierung der Caspasen untereinander zu verhindern, wurde der breit wirkende Caspaseninhibitor zVAD-fmk verwendet, welcher alle Caspasen durch Reaktion mit dem katalytischen Cystein und dessen kovalenter Bindung blockiert.

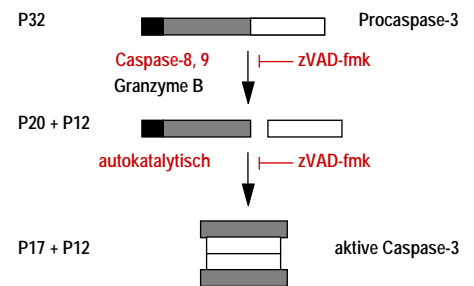
A



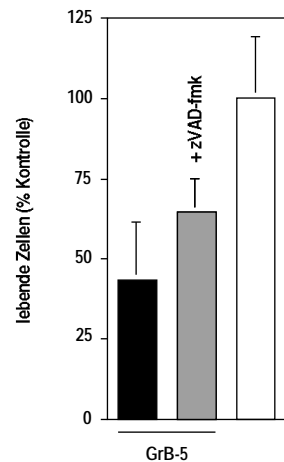
B



C



D



E

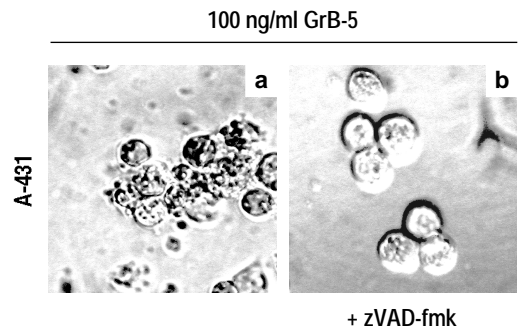


Abb. 2.20 | **Aktivierung endogener Caspasen durch GrB-T und GrB-5.** (A) **Aktivierung von Caspase-3, -8 und -9, nach Behandlung von A-431 Zellen mit GrB-T und GrB-5.** A-431 wurden mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GrB-5, 0,5 $\mu\text{g/ml}$ GrB-T oder 0,5 $\mu\text{g/ml}$ GrB (entsprechend jeweils äquimolaren Mengen) in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 μM Chloroquin kultiviert. 100 μM zVAD-fmk wurden zusammen mit den Proteinen zugegeben, um die Aktivität endogener Caspasen zu inhibieren. Nach 14 h wurden Gesamtzellextrakte präpariert. Die Aktivität von Caspase-3 in diesen Lysaten wurde durch Zugabe des colorimetrischen Peptidsubstrats Ac-DEVD-pNA gemessen, das bevorzugt von Caspase-3 gespalten wird. Zur Quantifizierung der Aktivität von Caspase-8 und -9 wurden die fluorimetrischen Peptidsubstrate Ac-IETD-AFC und Ac-LEHD-AFC verwendet. Aktivitäten wurden anhand der Freisetzung der colorimetrischen bzw. fluorimetrischen Gruppen quantifiziert. (B) **Spaltung von endogener Caspase-3 durch GrB-5 und GrB-T.** Um die Spaltung von endogener Caspase-3 zu analysieren, wurden die gleichen Extrakte wie in A elektrophoretisch getrennt und im Western blot mit einem Caspase-3 spezifischen mAk analysiert, der ein Epitop der großen Untereinheit erkennt. (C) **Schematische Darstellung der Aktivierung von Caspase-3.** Caspase-3 wird in zwei Schritten aktiviert: Zunächst wird inaktive Procaspase-3 durch aktive Caspase-3, -8, -9 oder durch GrB zwischen großer und kleiner Untereinheit gespalten

(entstehende Fragmente: P20 und P12). In einem zweiten Schritt wird die Prodomäne autokatalytisch abgespalten. Der Caspaseninhibitor zVAD-fmk inhibiert die Spaltung von Procaspase-3 durch andere Caspasen und blockiert auch die autokatalytische Prozessierung der Prodomäne. Dieser Inhibitor blockiert jedoch nicht GrB. **(D+E) Cytotoxische Aktivität von GrB-5 in Gegenwart von zVAD-fmk.** A-431 Zellen wurden für 14 h mit 100 ng/ml GrB-5 und 100 μ M Chloroquin in Gegenwart oder Abwesenheit von 100 μ M zVAD-fmk inkubiert und mikroskopisch analysiert **(E)**. Die Überlebensrate der Zellen bezogen auf Zellen, die nur mit Chloroquin behandelt waren, wurde durch Zugabe von MTT quantifiziert **(D)**.

In diesen Experimenten zeigte sich, daß trotz Hemmung der enzymatischen Aktivität endogener Caspasen durch zVAD-fmk die Spaltung endogener Caspase-3 nach Behandlung mit GrB Fusionsproteinen nicht verhindert werden konnte (Abb. 2.20 B). Um Spaltung von Caspase-3 nachzuweisen, wurden Lysate von A-431 Zellen, die mit GrB-5 oder GrB-T behandelt waren, im Western blot auf Prozessierung von Procaspase-3 untersucht. Die Aktivierung der Caspase-3 geschieht in zwei Schritten (Abb. 2.20 C): Zunächst wird das Proenzym (P32) zwischen großer und kleiner Untereinheit gespalten, wodurch die beiden P20 und P12 Fragmente entstehen. In einem zweiten Schritt wird die Prodomäne der P20 Untereinheit autokatalytisch entfernt, so daß das P17 Spaltprodukt entsteht. Zwei P17 und zwei P12 Untereinheiten der Caspase-3 bilden schließlich ein enzymatisch aktives Heterotetramer.

Mit einem Caspase-3 spezifischen Antikörper, der ein Epitop in der großen Untereinheit detektiert und so die P32, P20 und P17 Fragmente der Caspase-3 erkennt, konnten sowohl die P20 als auch die P17 Spaltprodukte in Extrakten von Zellen detektiert werden, die mit GrB-5 oder GrB-T in Gegenwart von Chloroquin behandelt waren (Abb. 2.20 B). In Abwesenheit von Chloroquin wurde keine Spaltung von endogener Caspase-3 beobachtet. In Gegenwart des Caspaseninhibitors zVAD-fmk in Kombination mit den Fusionsproteinen konnte zwar die autokatalytische Prozessierung der Caspase-3 und so die Bildung der P17 Untereinheit verhindert werden, nicht aber das Auftreten des P20 Spaltproduktes (Abb. 2.20 B).

Da die enzymatische Aktivität endogener Caspasen durch zVAD-fmk inhibiert war (Abb. 2.20 A), kann die initiale Spaltung von Procaspase-3 (P32) und so die Entstehung des P20 Spaltproduktes nicht durch Aktivität endogener Caspasen hervorgerufen worden sein. GrB hingegen wird nicht durch zVAD-fmk inhibiert und ist das einzige bekannte Enzym neben Caspase-3 (autokatalytisch), Caspase-8 und Caspase-9, welches Caspase-3 aktivieren kann. Diese Daten zeigen, daß die initiale Spaltung von endogener Caspase-3 durch exogenes GrB, also durch GrB-5 und GrB-T erfolgt ist.

3.2.11 Zusammenfassung der Abschnitte 3.2.1 bis 3.2.10

Die in *Pichia pastoris* exprimierten Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T sind bifunktional. Die GrB Domäne der Fusionsproteine weist eine vergleichbare enzymatische Aktivität wie nicht-fusioniertes rekombinantes GrB auf und spaltet eine rekombinante Form der Procaspase-3. Durch die Zellbindungsdomänen scFv(FRP5) und TGF α binden die Fusionsproteine spezifisch an die jeweiligen Zielrezeptoren ErbB2 und EGFR auf der Oberfläche von Tumorzellen. Nach der Aufnahme der Proteine befinden sich diese in vesikulären Strukturen, aus denen sie durch das endosomolytische Reagenz Chloroquin

freigesetzt werden können. Nach dieser cytosolischen Translokation weisen GrB-5 und GrB-T eine hohe cytotoxische Aktivität gegenüber etablierten Tumorzelllinien auf, die den jeweiligen Zielrezeptor überexprimieren, rezeptornegative Zellen hingegen sind auch bei hohen Proteinkonzentrationen nicht sensitiv gegenüber diesen Proteinen. Die IC_{50} Werte der hier untersuchten Proteine liegen in Gegenwart von Chloroquin im pico- bis nanomolaren Bereich und sind vergleichbar mit denen rekombinanter Immuntoxine mit Effektordomänen bakteriellen oder pflanzlichen Ursprungs. GrB Fusionsproteine aktivieren Caspase-3 durch einen direkten Mechanismus und induzieren innerhalb weniger Stunden eine ausgeprägte apoptotische Morphologie in Zielzellen.

Um die weitere Charakterisierung von GrB-5 und GrB-T zu erleichtern, wurde in dieser Arbeit ein Schwerpunkt darauf gelegt, die Ausbeute dieser Fusionsproteine bei der Expression in der Hefe *Pichia pastoris* zu optimieren. Dadurch sollten die Voraussetzungen für die Herstellung großer Mengen an GrB Fusionsproteinen für einen späteren Einsatz in *in vivo* Experimenten geschaffen werden. Während dies im Rahmen dieser Arbeit noch nicht umfassend umgesetzt werden konnte, wurden jedoch vielversprechende Daten gewonnen, die den grundsätzlichen Nutzen dieses Ansatzes belegen. Diese Daten sind daher im Folgenden dargestellt.

3.3 Optimierte Expression rekombinanter Proteine in der Hefe *Pichia pastoris*

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine im prokaryotischen Expressionssystem *E. coli* ist relativ einfach zu handhaben und kann zur Produktion großer Proteinmengen führen. Die Löslichkeit solcher heterolog exprimierter Proteine ist jedoch häufig gering und es bilden sich oft unlösliche Proteinaggregate (Fahnert *et al.*, 2004; Gribskov und Burgess, 1983; Ho und Middelberg, 2004). Diese entstehen meist durch falsche Proteinfaltung, wodurch hydrophobe Bereiche des gewünschten Proteins exponiert sind und so zur Interaktion mit hydrophoben Bereichen anderer Polypeptidketten zur Verfügung stehen (Goloubinoff *et al.*, 1999; Jaenicke, 1998). Ein Ansatz, die Löslichkeit heterolog exprimierter Proteine zu erhöhen, besteht darin, sie in Form von Fusionsproteinen mit einer gut löslichen Proteindomäne als „solubilizing agent“ zu exprimieren (Nygren *et al.*, 1994; Uhlen *et al.*, 1992). Hierzu eingesetzte Fusionspartner sind z.B. die Glutathion S-Transferase (GST) (Tudyka und Skerra, 1997), Thioredoxin (TRX) (LaVallie *et al.*, 1993), Ubiquitin (Power *et al.*, 1990), Protein A (Samuelsson *et al.*, 1994), DsbA (Zhang *et al.*, 1998), Domäne 1 des IF2 von *E. coli* (Sorensen *et al.*, 2003), und das Maltose Bindungsprotein (MBP) (di Guan *et al.*, 1988; Kapust und Waugh, 1999). Natürlicherweise ist MBP Teil des Maltodextrin-Transportsystems im Periplasma von *E. coli*, wo es an der Bindung von Maltodextrinen und deren Transport zu anderen Proteinkomplexen beteiligt ist (Ehrmann *et al.*, 1998). Neben der Expression im Periplasma, wo MBP natürlicherweise vorkommt, kann MBP auch in großen Mengen im bakteriellen Cytoplasma exprimiert werden. Für eine Reihe heterologer Proteine konnte gezeigt werden,

daß ihre Löslichkeit und Stabilität durch Fusion mit MBP erhöht wird (Hayhurst, 2000; Jacquet *et al.*, 1999; Pryor und Leiting, 1997; Yoda *et al.*, 2000). Dies wird dadurch erklärt, daß MBP die korrekte Faltung des Fusionspartners fördert. Aus diesem Grunde wurde MBP im Kontext von Fusionsproteinen auch als Chaperon bezeichnet (Bach *et al.*, 2001; Kapust und Waugh, 1999). Die stabilisierenden und die Löslichkeit verbessernden Eigenschaften von MBP führen bei der heterologen Expression in *E. coli* häufig zu einer Steigerung der Ausbeute an löslichem Fusionsprotein im Vergleich zum unfusioniert exprimierten Protein. Zahlreiche Proteine können allerdings, auch in Form solcher Fusionsproteine, nicht in funktionaler Konformation in *E. coli* exprimiert werden. Im Vergleich zu prokaryotischen Expressionssystemen liegt der Vorteil eukaryotischer Systeme in der umfassenderen Fähigkeit zur Prozessierung, Faltung und posttranslationalen Modifizierung (z. B. Glycosylierung) heterolog exprimierter Proteine. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, in denen oft nur geringe Mengen heterolog exprimierter Proteine hergestellt werden können, stellen Hefen ideale Organismen zur Expression rekombinanter Proteine in großen Mengen dar [Übersicht: (Cereghino und Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000)]. Neben der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wird auch die methylotrophe Hefe *Pichia pastoris* eingesetzt, da sie einen starken induzierbaren Promotor besitzt, der zur Steuerung der Expression verwendet werden kann. Durch Nutzung des starken *aox1* Promotors in *Pichia pastoris* (vgl. Abschnitt 3.2.1) wird es möglich, im Vergleich zu *Saccharomyces cerevisiae*, der ein ähnlich gut induzierbarer Promotor fehlt, rekombinante Proteine in deutlich größeren Mengen zu exprimieren (Buckholz und Gleeson, 1991).

In Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, die stabilisierenden und Löslichkeit verbessernden Eigenschaften der „solubilizing agents“ auf das *Pichia pastoris* Expressionssystem zu übertragen. Letztendlich sollte damit die Voraussetzung für die Herstellung großer Mengen an GrB Fusionsproteinen für einen späteren Einsatz in *in vivo* Experimenten geschaffen werden. Während dies im Rahmen dieser Arbeit noch nicht umfassend umgesetzt werden konnte, wurden jedoch am Beispiel von nicht fusioniertem GrB und einem Fragment der extrazellulären Domäne von ErbB2 vielversprechende Daten gewonnen, die den grundsätzlichen Nutzen dieses Ansatzes belegen.

Ein Nachteil der Fusion von Proteinen mit heterologen Proteindomänen, die die Löslichkeit erhöhen, ist die mögliche Beeinflussung der biologischen Aktivität des Fusionspartners. Aus diesem Grunde werden „solubilizing agents“ häufig nach der Proteinexpression und -reinigung durch Zugabe spezifischer Proteasen abgespalten. Hierzu werden Protease-Erkennungssequenzen zwischen „solubilizing agent“ und Fusionspartner eingefügt. „solubilizing agent“, ungespaltenes Protein und zugesetzte Proteasen müssen dann in weiteren Reinigungsschritten getrennt werden. Um dies zu umgehen, wurde in dieser Arbeit versucht, eine endogene, im sekretorischen Weg von *Pichia pastoris* vorhandene Protease zu nutzen, um die Proteindomäne, die als „solubilizing agent“ wirkt, bereits während der Sekretion *in vivo* vom Fusionspartner zu trennen.

Um das Protein in den sekretorischen Weg zu leiten, wurde das bereits in Abschnitt 3.2.1 beschriebene α -Faktor Sekretionssignal von *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt, das in *Pichia pastoris* die Sekretion angehängter Polypeptidketten in den Kulturüberstand bewirkt. Während der Sekretion wird

das Sekretionssignal durch die endogene *Pichia* Protease Kexin (KEX2) abgespalten. Kexin gehört zu einer Familie von Endoproteasen, die Homologie zu bakteriellen Subtilisinen und Subtilisin-ähnlichen Proteasen der Säugetiere aufweisen. Diese Endoproteasen spalten ihre Substrate C-terminal von gepaarten basischen Aminosäuren (Fuller *et al.*, 1989). Ein humaner Vertreter dieser Proteinfamilie ist die Endoprotease Furin. Furin vermittelt die Reifung vieler Vorläuferproteine, wie des Insulin Prorezeptors, des HIV gp160 Glycoproteins, des Ebolavirus Glycoproteins und des Anthrax protektiven Antigens (Rockwell und Thorner, 2004). Mit Hilfe biochemischer Methoden wurde eine synthetische, optimale Furin-Erkennungssequenz identifiziert (Krysan *et al.*, 1999). Die optimierte Furin Erkennungssequenz sollte aufgrund der Homologie von Furin zu der *Pichia* Endoprotease Kexin auch ein gutes Substrat für diese Protease im sekretorischen Weg von *Pichia pastoris* darstellen.

Um zu untersuchen, ob das „solubilizing agent“ während der Sekretion in *Pichia pastoris* exprimierter Proteine durch eine endogene proteolytische Aktivität abgespalten werden kann, wurde ein Expressionskonstrukt bestehend aus MBP als „solubilizing agent“ und ErbB2₁₋₂₂₂ als Modellprotein hergestellt. Als Proteaseschnittstelle wurde die optimierte Erkennungssequenz der Endoprotease Furin verwendet, die in den Expressionskonstrukten zwischen „solubilizing agent“ und ErbB2₁₋₂₂₂ lokalisiert ist. ErbB2₁₋₂₂₂ wurde ausgewählt, da es grundsätzlich in der Hefe *Pichia pastoris* exprimierbar ist (Gerstmayer, 1997) und auch im Rahmen dieser Arbeit als rekombinantes Protein eingesetzt wurde (Abschnitt 3.1.2+3.2.6). Das Expressionskonstrukt pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂ (Gerstmayer, 1997), welches in früheren Arbeiten zur Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ in Hefe eingesetzt wurde, diente als Referenzkonstrukt. Daneben wurde ein entsprechend aufgebautes Konstrukt abgeleitet, das die Sequenz von reifem GrB enthält. Es wurde untersucht, ob sich das hier modifizierte *Pichia* Expressionssystem auch zur Generierung von enzymatisch aktivem GrB eignet. Dies ist eine Grundvoraussetzung für die spätere Expression von bifunktionalen GrB Fusionsproteinen in diesem System. Zum Vergleich wurde ein Konstrukt zur Expression von GrB als N-terminales Fusionsprotein mit GST als „solubilizing agent“ konstruiert. Die verwendeten Expressionskonstrukte sind schematisch in Abb. 3.21 gezeigt. Anhand der Modellproteine wurden im Rahmen dieser Arbeit zunächst folgende Fragestellungen untersucht:

- Ist durch die Fusion des „solubilizing agent“ MBP in *Pichia pastoris* eine Ausbeutesteigerung an löslichem Protein möglich?
- Ist es möglich, durch Verwendung der Furin-Erkennungssequenz das „solubilizing agent“ während der Sekretion rekombinanter Proteine in den Kulturüberstand durch Nutzung einer endogenen proteolytischen Aktivität *in vivo* vom gewünschten Produkt zu trennen?

3.3.1 Modifizierte Expressionskonstrukte zur Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ und GrB in *Pichia pastoris*

Zur Herstellung von Plasmiden für die Expression des N-terminalen Fragments des humanen ErbB2 (ErbB2₁₋₂₂₂) wurde ein MBP-furS PCR Fragment generiert. Dazu wurden die Primer 5'NdeI-MBP und 3'XhoI-SalI-furS-MBP verwendet. Das Plasmid pMAL-NN-EGFP (Bach *et al.*, 2001), das die MBP Sequenz des Plasmids pMALc (New England Biolabs) enthält, diente bei der Reaktion als „template“.

Die Sequenz, die für die optimierte Furin-Erkennungssequenz kodiert (Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg-Ser) (Krysan *et al.*, 1999), wurde mit Hilfe des 3' Primers an das 3' Ende der MBP Sequenz angefügt. Zudem wurden mit diesen Primern *SalI* und *XhoI* Schnittstellen zur Insertion des ErbB2₁₋₂₂₂ Fragments eingefügt. Das resultierende PCR-Fragment wurde mit *NdeI* und *XhoI* geschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen des Plasmids pBIIKS-MH (Gerstmayer, 1997) eingesetzt. Das so gewonnene Plasmid wurde mit pBIIKS-MBP-furS bezeichnet. Die Sequenz des humanen ErbB2₁₋₂₂₂ wurde aus dem Plasmid pSW5-ErbB2₁₋₂₂₂ (Rohrbach *et al.*, 2005) als *SalI XhoI* Fragment erhalten und in die *SalI XhoI* Schnittstellen von pBIIKS-MBP-furS inseriert. Mit den Enzymen *AvrII* und *NotI* wurde die Sequenz kodierend für MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ aus diesem Plasmid ausgeschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Hefeexpressionsvektors pPIC9 inseriert. Der resultierende Expressionsvektor pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ ist schematisch in Abb. 3.21 B dargestellt. Das Plasmid pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂, das als Referenz für die Expression von unfusioniertem ErbB2 diente, ist analog aufgebaut (Gerstmayer, 1997).

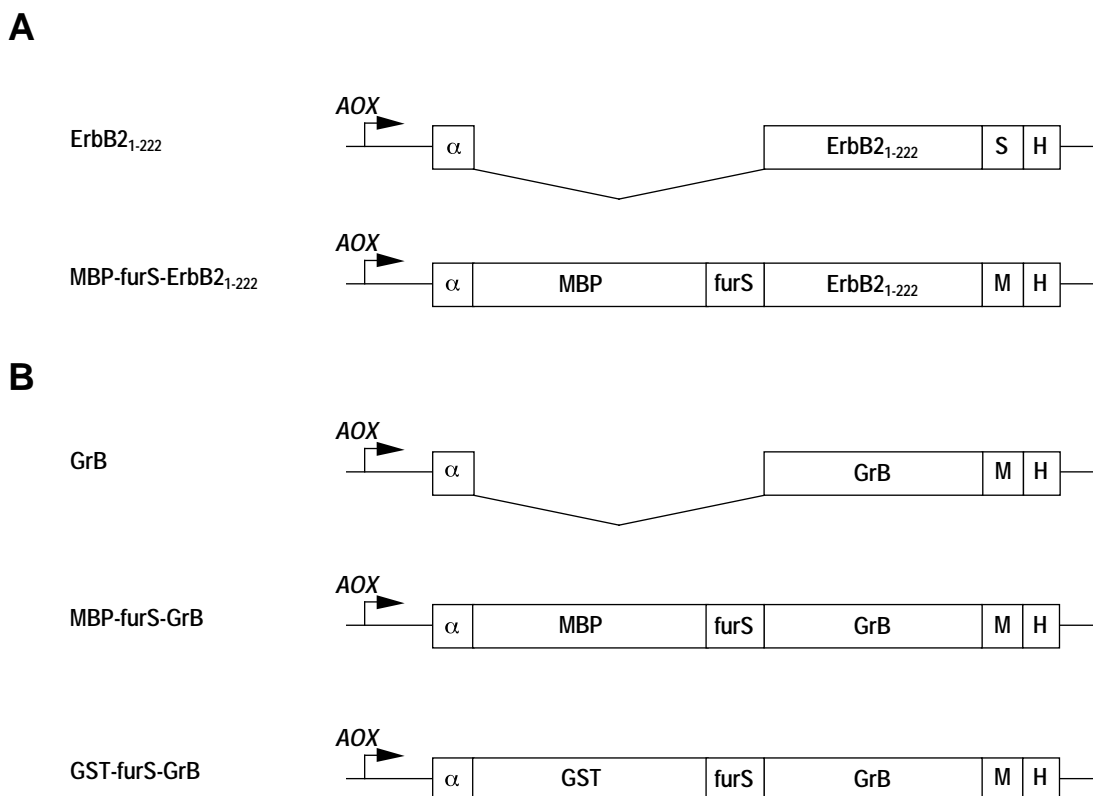


Abb. 3.21 | Konstrukte zur Expression von GrB (Aminosäuren 21-247) (A) und ErbB2 (Aminosäuren 1-222) (B). ErbB2₁₋₂₂₂ oder GrB wurden entweder als unfusionierte Proteine, oder als Fusionsproteine mit dem *Escherichia coli* „maltose binding protein“ (MBP) oder der *Schistosoma japonicum* Glutathion S-Transferase (GST) exprimiert. Alle Expressionskonstrukte enthalten das N-terminale α -Faktor Signalpeptid, das die Sekretion der Proteine in den Kulturüberstand bewirkt. Um *in vivo* die Prozessierung der Fusionsproteine durch die *Pichia* Protease KEX2 zu ermöglichen, enthalten die Proteine zwischen MBP bzw. GST Domäne und dem jeweiligen Fusionspartner eine optimierte Proteaseschnittstelle der Endopeptidase Furin (furS, Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg-Ser). Zusätzlich enthalten die Konstrukte am C-Terminus einen Hexahistidin-tag (H) und ein Epitop des mAk 9E10 (M) bzw. des mAk SWA11 (S).

Zur Herstellung der GrB Expressionskonstrukte wurde ein für furS-GrB kodierendes PCR-Fragment mit den Oligonukleotidprimern 5'*XbaI*-furS-GrB und 3'*XhoI*-STOP-His und dem Plasmid pPIC9-GrB (Giesübel, 2003) als „template“ generiert. Das Amplifikat wurde mit *XbaI* und *XhoI* geschnitten und in die entsprechenden Schnittstellen des Plasmids pBIKS-MH inseriert. Die Sequenzen, die für MBP oder GST kodieren, wurden ebenfalls als PCR Fragmente erhalten. Dazu wurden die Primerpaare 5'*NdeI*-MBP / 3'*XbaI*-MBP bzw. 5'*NdeI*-GST / 3'*XbaI*-GST und die Plasmide pMAL-NN-EGFP bzw. pGEX-4T-1 (Amersham, Freiburg) als „template“ verwendet. Die MBP und GST PCR-Fragmente wurden in die *NdeI* und *XbaI* Restriktionsschnittstellen von pBIKS-furS-GrB-MH inseriert. Aus den resultierenden Plasmiden wurden die MBP-furS-GrB-MH und GST-furS-GrB-MH Fragmente mit den Enzymen *AvrII* und *NotI* herausgeschnitten und in die entsprechenden Restriktionsschnittstellen von pPIC9 inseriert, wodurch die Expressionsvektoren pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-GST-furS-GrB entstanden (Abb. 3.21 A).

3.3.2 Analyse des verstärkenden Effekts der MBP-furS Proteindomäne auf die Expression von GrB und

ErbB2₁₋₂₂₂ in der Hefe *Pichia pastoris*

Zur Expression wurden *Pichia pastoris* GS115 Zellen mit den linearisierten Expressionskonstrukten pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂, pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂, pPIC9-GrB, pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-GST-furS-GrB transformiert, und positive Klone wurden, wie im Abschnitt 2.2.7 beschrieben, selektioniert. Für jeweils acht Hefeklone wurde die Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ (Daten nicht gezeigt) und GrB (Abb. 3.22 A) im Western blot nach viertägiger Induktion mit ErbB2 bzw. GrB spezifischen Antikörpern analysiert. Für jedes Expressionskonstrukt wurde ein Klon, der ein repräsentatives Expressionsniveau zeigte, ausgewählt und für die weiteren Expressionsanalysen verwendet (ausgewählte Klone sind in Abb. 3.22 A mit * markiert). Mit diesen Klonen wurden wie in Abschnitt 2.2.10 beschrieben Expressionskulturen im größeren Maßstab angeimpft. Als Referenzkonstrukt zur Expression von GrB diente in den folgenden Experimenten ein mit pPIC9-GrB transformierter Klon, der in früheren Expressionsanalysen ausgewählt wurde, weil er ein besonders hohes Expressionsniveau aufwies (Giesübel, 2003).

Überstände der Expressionskulturen wurden im Western blot auf ErbB2₁₋₂₂₂- (Daten nicht gezeigt) bzw. GrB-Expression (Abb. 3.22 B) untersucht. Die von mit pPIC9-GrB, pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-GST-furS-GrB transformierten Hefeklonen exprimierten Proteine waren jeweils als eine einzelne Bande bei etwa 40 kDa detektierbar (Abb. 3.22 B). Dies zeigt, daß GST-furS-GrB und MBP-furS-GrB Fusionsproteine vollständig prozessiert wurden. Das theoretische Molekulargewicht der nicht-prozessierten Proteine beträgt 71 kDa für MBP-furS-GrB, 56 kDa für GST-furS-GrB und 29 kDa für unfusioniertes GrB. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, wird GrB in der Hefe *Pichia pastoris* als Glycoprotein mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 40 kDa (Giesübel, 2003) synthetisiert.

Vergleichbare Daten wurden auch mit ErbB2₁₋₂₂₂ und MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ Expressionskonstrukten erhalten. Mit dem ErbB2₁₋₂₂₂ spezifischen mAk FRP5 war in Kulturüberständen beider Klone jeweils nur eine Bande mit identischem Molekulargewicht detektierbar, die dem apparenten Molekulargewicht von

glycosyliertem ErbB2₁₋₂₂₂ entspricht (vgl. 3.23 A).

Die Menge an GrB in den Kulturüberständen der verschiedenen Hefeklone unterschied sich bei den durchgeführten Expressionsanalysen erheblich. Das MBP-furS-GrB Expressionskonstrukt lieferte deutlich größere Mengen an rekombinantem Protein als mit dem herkömmlichen Expressionskonstrukt (Referenzkonstrukt) erhalten wurden (Abb. 3.22 B). Das GST-furS-GrB Expressionskonstrukt hingegen lieferte deutlich geringere Proteinmengen als das Referenzkonstrukt. Vergleichbare Daten wurden ebenfalls bei der ErbB2₁₋₂₂₂ Expression mit den Expressionskonstrukten MBP-fur-ErbB2₁₋₂₂₂ und ErbB2₁₋₂₂₂ (Referenzkonstrukt) erhalten (vg. 3.23 A). Auch hier bewirkte die MBP-furS Domäne am N-Terminus des ErbB2₁₋₂₂₂ eine deutliche Steigerung der Ausbeute an prozessiertem ErbB2₁₋₂₂₂.

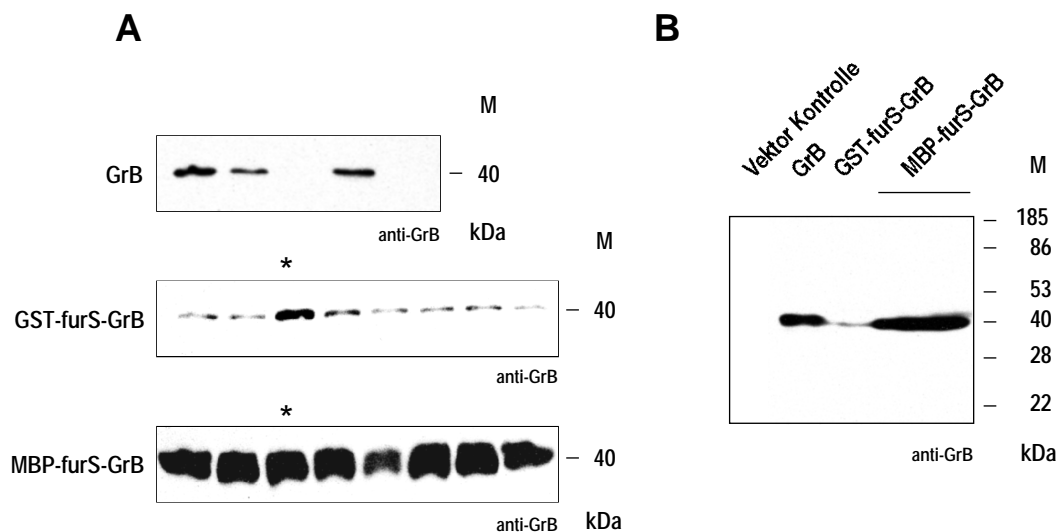


Abb. 3.22 | **Expressionsanalysen.** (A) Kulturüberstände verschiedener *Pichia pastoris* Expressionsklone, die mit pPIC9-GrB, pPIC9-GST-furS-GrB oder pPIC9-MBP-furS-GrB transformiert waren. Überstände nach viertägiger Induktion wurden im Western blot mit dem GrB spezifischen mAk 2C5 analysiert. In jeder Spur wurde Kulturüberstand eines Klons aufgetragen. Klone, die mit einem Stern markiert sind, wurden für alle nachfolgenden Experimente verwendet. (B) Vergleich des Expressionsniveaus von Hefeklonen, die mit pPIC9-GrB, pPIC9-GST-furS-GrB oder pPIC9-MBP-furS-GrB transformiert sind. Weitere Erläuterungen im Text.

Um diese durch die MBP-furS Domäne hervorgerufene Ausbeutesteigerung zu quantifizieren, wurden erneut Expressionskulturen mit den zuvor verwendeten Hefeklonen angeimpft und, wie zuvor beschrieben, kultiviert und induziert. Täglich wurden Proben zur Messung der Zelldichte und zur Analyse der Proteinexpression entnommen. Die Proben wurden abzentrifugiert und GrB bzw. ErbB2₁₋₂₂₂ in diesen Überständen wurden im Western blot mit den mAk 2C5 bzw. FRP5 detektiert (Abb. 3.23 A). Die auf den Röntgenfilmen sichtbaren Banden wurden mit dem Programm ImageJ 1.32j (NCBI) durch Bestimmung der mittleren Grauwerte (MGV, „mean gray values“) quantifiziert. Die in Abb. 3.23 B genannten Werte wurden relativ zu den Werten berechnet, die mit den pPIC9-MBP-furS-GrB bzw. pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ Expressionsklonen am Tag vier nach Induktionsbeginn erhalten wurden (jeweils höchster gemessener MGV, definiert als 1). Die in diesen Expressionsanalysen erhaltenen Proteinausbeuten waren

bei den Klonen, die mit den MBP-furS Konstrukten transformiert waren, erneut deutlich höher, als bei Klonen, die mit dem jeweiligen Referenzkonstrukt transformiert waren.

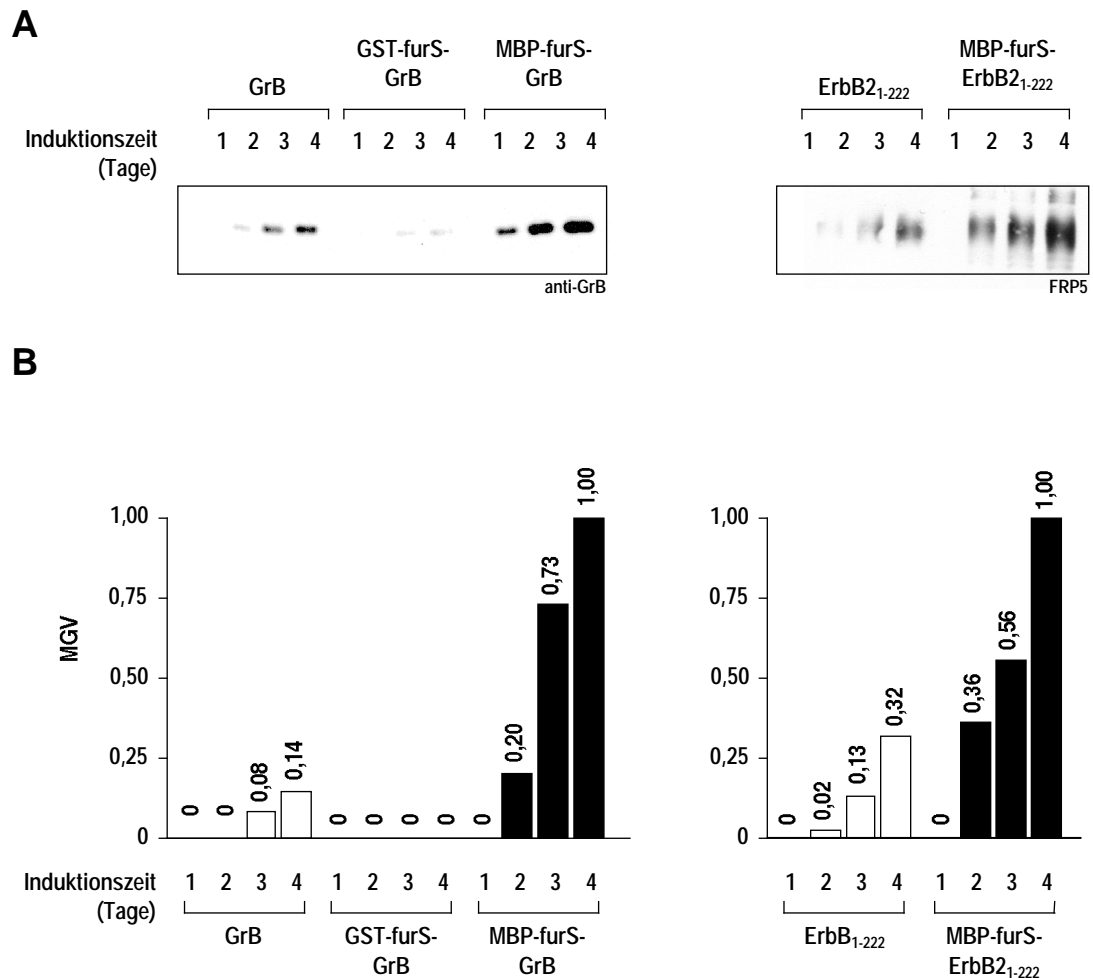


Abb. 3.23 | **Quantifizierung von GrB bzw. ErbB2₁₋₂₂₂ in Hefekulturüberständen.** (A) **Western blot Analysen.** Aus Überständen von *Pichia pastoris* Expressionskulturen, die mit pPIC9-GrB, pPIC9-GST-furS-GrB, pPIC9-MBP-furS-GrB, pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂ oder pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ transformiert waren, wurden alle 24 h Proben entnommen. Sekretiertes GrB und ErbB2₁₋₂₂₂ wurde im Western blot mit dem GrB spezifischen mAk 2C5 oder dem ErbB2 spezifischen mAk FRP5 detektiert. (B) **Quantifizierung der Proteinmengen.** Die Proteinmengen in Kulturüberständen wurden anhand der Bandenintensitäten der Western blots mit dem Programm ImageJ 1.32 (NCBI) durch Messung mittlerer Grauwerte („mean gray values“) quantifiziert. Die gemessenen Werte wurden relativ zu den Werten berechnet, die mit dem jeweiligen MBP-furS Expressionskonstrukten am Tag vier nach der Induktion erhalten wurden (höchstes Expressionsniveau als 1 definiert).

Mit pPIC9-MBP-furS-GrB transformierte Klone lieferten nach dreitägiger Induktion eine etwa neunfach höhere GrB Proteinmenge. Nach viertägiger Induktion wurde eine Ausbeutesteigerung um den Faktor sieben gemessen. Die sehr geringe Proteinausbeute, die das GST-furS-GrB Expressionskonstrukt lieferte (Abb. 3.23 A), lag bei den verwendeten Einstellungen der Software unterhalb der Nachweisgrenze. Der MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ Expressionsklon lieferte nach dreitägiger Induktion etwa die vierfache ErbB2₁₋₂₂₂ Menge, nach vier Tagen etwa die dreifache Menge. Die hier eingesetzte Methode, Proteinmengen in Hefekulturüberständen miteinander zu vergleichen, wird dadurch eingeschränkt, daß starke Signale zu

einer maximalen Schwärzung des Films führen (Sättigung). Diese Signale können nicht weiter verstärkt werden, und die bestimmten Werte werden als zu klein gemessen. Daher erscheinen die nach dreitägiger Induktion bestimmten relativen Werte zuverlässiger als die Werte, die nach viertägiger Induktion gemessen wurden.

Die Expressionsverstärkung von GrB und ErbB2₁₋₂₂₂ bei der heterologen Expression dieser Proteine in der Hefe *Pichia pastoris* hing hierbei, wie in Abb. 3.24 gezeigt, nicht von unterschiedlichen Wachstumskinetiken der jeweiligen Hefeklone ab. Die Messung der Zelldichten zeigte, daß das Wachstum der verwendeten Hefeklone im induzierten Zustand identisch war.

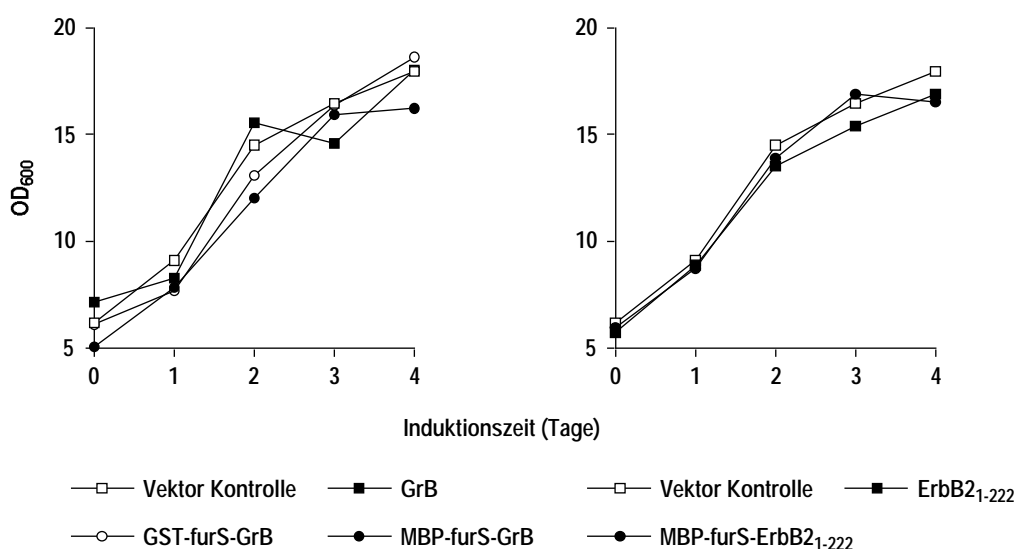


Abb. 3.24 | **Wachstumskinetiken der Expressionsklone.** Aus Überständen von *Pichia pastoris* Expressionsklonen, die mit pPIC9-GrB, pPIC9-GST-furS-GrB, pPIC9-MBP-furS-GrB, pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂ oder pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ transformiert waren, wurden alle 24 h Proben entnommen und die OD₆₀₀ gemessen.

Die oben dargestellten Daten zeigen, daß die MBP Domäne in der Hefe *Pichia pastoris* zu einer deutlichen Steigerung der Ausbeute von löslichem GrB und ErbB2₁₋₂₂₂ verwendet werden kann. Die MBP Domäne konnte dabei durch Nutzung einer endogen kodierten Protease vollständig vom Fusionspartner getrennt werden. So entfällt der potentielle Nachteil, der sich durch MBP Fusion ergibt, nämlich die Notwendigkeit der Abspaltung der MBP Domäne *in vitro* mit anschließender Proteinreinigung. Dieses Prinzip der Ausbeutesteigerung, nämlich die N-terminale Fusion eines „solubilizing agent“, das post-translational *in vivo* durch Nutzung einer endogen kodierten Protease abgespalten wird, wurde meiner Kenntnis nach in dieser Arbeit erstmals verwendet und könnte eine breit anwendbare, neue Strategie der Ausbeutesteigerung bei der Expression rekombinanter Proteine darstellen.

In Western blot Analysen der Hefekulturüberstände mit Antikörpern, die die MBP bzw. GST Domänen der GrB Fusionsproteine detektieren, wurden diese Domänen als jeweils eine Bande mit apparenten Molekulargewichten von etwa 25 bzw. 40 kDa detektiert (Abb. 3.25). Die aus den

Primärsequenzen berechneten Molekulargewichte betragen 40,6 kDa (MBP) bzw. 25,7 kDa (GST). Diese Daten zeigen, daß beide Proteindomänen in den Kulturüberstand sekretiert wurden und, wie schon zuvor mit dem GrB spezifischen mAk demonstriert wurde, vollständig von der GrB Proteindomäne getrennt waren. Unprozessierte Fusionsproteine konnten nicht detektiert werden.

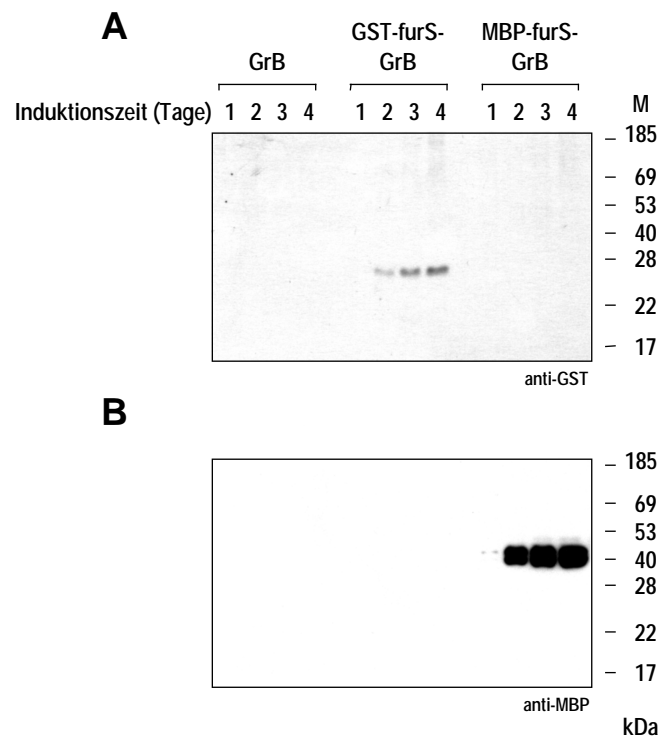


Abb. 3.25 | **Western blot Analysen von Hefekulturüberständen der GrB Expressionsklone.** Die Sekretion der GST und MBP Proteindomänen durch die mit den GrB Expressionskonstrukten transformierten Hefeklone wurde in Western blot Analysen mit einem GST- (**A**) bzw. MBP spezifischen (**B**) Antikörper untersucht.

3.3.3 Analyse der *Pichia pastoris* Expressionsklone

Die um ein Vielfaches erhöhten Ausbeuten, die durch N-terminale Fusion der MBP-furS Domäne an GrB oder ErbB2₁₋₂₂₂ erreicht werden konnten, zeigen, daß diese Domäne als Expressionsverstärker im Kontext der hier konstruierten Fusionsproteine agiert. Um zu untersuchen, ob sich dieser Effekt der MBP-furS Domäne auf Ebene der Transkription, der Translation oder posttranslational vollzieht, wurde die Expression von GrB mRNA in den verwendeten Hefeklonen bestimmt. Hierfür wurden quantitative TaqMan PCR Analysen etabliert und durchgeführt. Gesamt-RNA wurde aus *Pichia pastoris* Expressionskulturen präpariert, die für einen Tag in Gegenwart von 1 % MeOH induziert waren. cDNAs wurden hergestellt und per TaqMan PCR in einem Abi PRISM 7700 „sequence detection system“ quantifiziert. Plasmidverdünnungsreihen mit definierter Kopienzahl für GrB und GAPDH als „housekeeping gene“, das hier zur Normalisierung verwendet wurde, wurden simultan mit den Hefeproben analysiert. Die

ermittelten GrB/GAPDH mRNA Verhältnisse sind in Abb. 3.26 dargestellt. Klone, die mit den GrB Fusionskonstrukten (pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-GST-furS-GrB) transformiert waren, zeigten im Vergleich zum Referenzklon (pPIC9-GrB) leicht erhöhte relative GrB mRNA Level. Der pPIC9-GST-furS-GrB Expressionsklon wies dabei das höchste GrB/GAPDH mRNA Verhältnis auf, jedoch die geringste GrB Expression (Abb. 3.23 B). Diese Daten zeigen, daß die beobachteten starken Unterschiede bezüglich der Expression von GrB nicht mit den leicht unterschiedlichen GrB mRNA Levels korrelieren, ein transkriptioneller Effekt der MBP-furS Domäne also ausgeschlossen werden kann. Dies bedeutet, daß die MBP-furS Domäne auf Ebene der Translation oder posttranslational agiert.

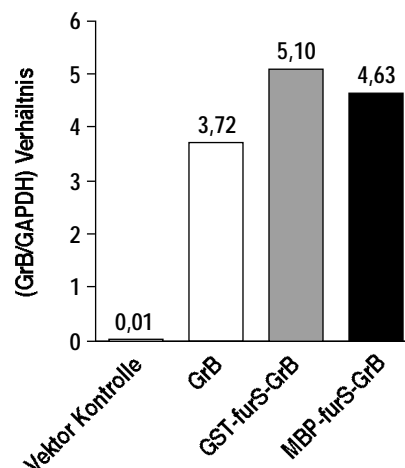


Abb. 3.26 | **Quantifizierung der GrB mRNA Expression in Hefeklonen.** GrB mRNA der Hefeexpressionsklone wurde in quantitativen TaqMan PCR Analysen gemessen. RNA aus Hefe-Expressionskulturen, die für 1 Tag induziert waren, wurde isoliert, in cDNA umgeschrieben und mit einem Abi PRISM 7700 „sequence detection system“ analysiert. Absolute Kopienzahlen wurden durch die simultane Analyse von GrB und GAPDH Plasmidverdünnungsreihen mit definierten Kopienzahlen bestimmt. Gemessene absolute Kopienzahlen von GrB wurden jeweils auf GAPDH Kopienzahlen normalisiert.

MBP kann im Kontext von Fusionsproteinen als Chaperon wirken, da es bei der Expression von Fusionsproteinen in *E. coli* die Löslichkeit und Stabilität von Fusionspartnern erhöht. Wenn diese Chaperonaktivität des MBP auch bei der Expression von Fusionsproteinen in *Pichia pastoris* besteht, sind höhere Ausbeuten an löslichem Fusionsprotein in Hefekulturüberständen zu erwarten als in Kulturen, die das gleiche Protein in nicht-fusionierter Form exprimieren. Dies wurde für beide im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Proteine MBP-furS-GrB und MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ beobachtet. Proteine, die durch Exocytose sekretiert werden, werden in die Membran oder in das Lumen des ER importiert und von dort zum Golgi Apparat transportiert, von wo aus der weitere Transport zur Cytoplasmamembran erfolgt. Für den vesikulären Transport müssen die Proteine korrekt gefaltet sein. Das zelluläre System, das die Faltung von Proteinen überwacht, wird als „ER quality control“ bezeichnet und ist in allen Eukaryoten, also auch in Hefen vorhanden (Ellgaard und Helenius, 2003; Kostova und Wolf, 2003). Falsch gefaltete Proteine werden im ER zurückgehalten und akkumulieren dort oder werden durch das Ubiquitin-

Proteasom System abgebaut.

Um zu untersuchen, ob GrB in Hefezellen akkumuliert, wurden Western blot Analysen mit Lysaten der Hefezellen durchgeführt (Abb. 3.27). Dabei konnten große Mengen an intrazellulärem GrB in der Expressionskultur beobachtet werden, in der GrB als unfusioniertes Protein exprimiert wurde. Mit dem GrB spezifischen mAk 2C5 wurden zwei Banden bei 44 kDa und 53 kDa gefärbt, die sehr wahrscheinlich der prozessierten glycosylierten Form des GrB (Bande bei 44 kDa) und der nicht-prozessierten Form des glycosylierten GrB (α -GrB, Bande bei 53 kDa) entsprechen (Das theoretische Molekulargewicht des α -Faktor Sekretionssignals beträgt 9 kDa).

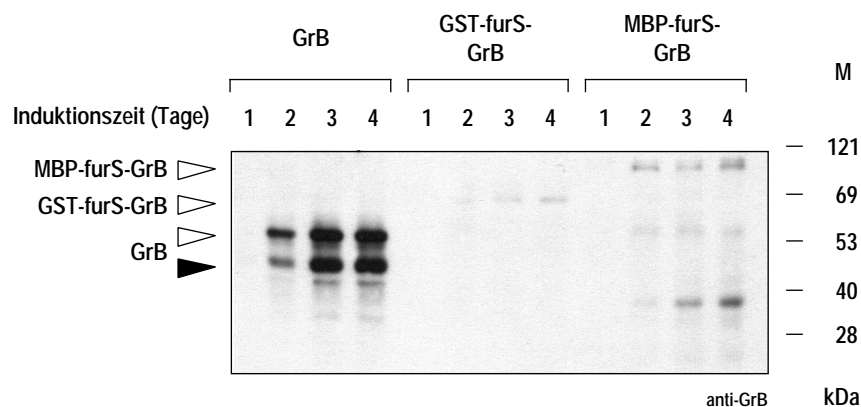


Abb. 3.27 | **Western blot Analyse von Hefezellysaten.** Zellysate von induzierten GrB-Expressionskulturen, die mit pPIC9-GrB, pPIC9-MBP-furS-GrB bzw. pPIC9-GST-furS-GrB transformiert waren, wurden im Western blot mit dem GrB spezifischen mAk 2C5 analysiert.

Diese Proteinakkumulation in der Hefe trägt damit zu einer verringerten GrB Menge in den Kulturüberständen bei. Im Falle der GST-furS-GrB und MBP-furS-GrB Fusionskonstrukte hingegen war eine Akkumulation von GrB im Inneren der Zellen nicht detektierbar (Abb. 3.27). Dies ist eine mögliche Erklärung für die Ausbeutesteigerung vermittelt durch die MBP-furS Domäne. Unprozessierte MBP-furS-GrB und GST-furS-GrB Proteine waren nur in sehr geringen Mengen in den Zellysaten vorhanden.

Diese Daten legen nahe, daß die MBP-furS Domäne die korrekte Faltung der GrB Domäne fördert und hierdurch eine effiziente Sekretion ermöglicht. MBP weist also sehr wahrscheinlich auch in der Hefe *Pichia pastoris* im Kontext von Fusionsproteinen die Eigenschaften eines Chaperons auf.

3.3.4 Enzymatische Aktivität von rekombinantem GrB exprimiert als MBP-furS Fusionsprotein

Zur Analyse der enzymatischen Aktivität von GrB, das als MBP-furS-GrB Fusionsprotein exprimiert wurde, wurden Hefeüberstände von MBP-furS-GrB Expressionskulturen in einem colorimetrischen Peptidspaltungsassays untersucht. Obwohl die MBP-furS Domäne bei der Expression von MBP-furS-GrB vollständig vom Fusionspartner GrB getrennt wurde, diese Domäne also die enzymatische Aktivität von

GrB nicht behindern konnte, war in den untersuchten Hefekulturüberständen keine GrB-Aktivität nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Da GrB unter physiologischen Bedingungen als Prä-Proenzym synthetisiert wird und erst nach der Abspaltung von Signalpeptid und inhibitorischem Dipeptid enzymatische Aktivität erlangt, lag die Vermutung nahe, daß das Serin innerhalb der furS-Sequenz, welches nach Spaltung durch Furin theoretisch am N-Terminus von GrB zurückbleibt (vgl. Abb. 3.28 C), die enzymatische Aktivität der Serinprotease inhibiert.

Um dies zu untersuchen, wurde ein pPIC9-MBP-fur-GrB Expressionskonstrukt hergestellt, bei dem das Serin innerhalb der Furin Erkennungssequenz fehlt (vgl. Abb. 3.28 C). Hierzu wurde mit Hilfe der Primer 5'XbaI-fur-GrB und 3'XhoI-STOP-His ein fur-GrB Fragment hergestellt. Das Plasmid pPIC9-GrB diente bei dieser Reaktion als „template“. Die weitere Konstruktion von pPIC9-MBP-fur-GrB erfolgte analog zur Herstellung von pPIC9-MBP-furS-GrB (vgl. 3.3.1).

Kulturüberstände von Expressionsklonen, die mit dem pPIC9-MBP-fur-GrB Konstrukt transformiert waren, wurden nach viertägiger Induktion im Vergleich zu Klonen, die mit pPIC9-MBP-furS-GrB transformiert waren, im Western blot auf Expression von GrB untersucht (Abb. 3.28 A+B). Zudem wurde die enzymatische Aktivität von GrB in den Hefekulturüberständen jeweils eines Expressionsklons in einem colorimetrischen Peptidspaltungsassay mit dem synthetischen GrB-Substrat Ac-IETD-pNA untersucht. Wie in Abb. 3.28 D gezeigt, war GrB Aktivität nur im Überstand des Expressionsklons meßbar, der mit dem pPIC9-MBP-fur-GrB Konstrukt transformiert war. Da sich beide Expressionskonstrukte nur durch Präsenz des Serins innerhalb der Furin-Erkennungssequenz unterscheiden, bedeutet dies, daß das Serin die enzymatische Aktivität von GrB vollständig inhibiert. Die Deletion des Serins innerhalb der Furin-Erkennungssequenz führte zwar zur Generierung vergleichbar hoher Proteinmengen bei der Expression von GrB, die Spaltung innerhalb der Furin-Erkennungssequenz erfolgte aber nicht mehr vollständig (Abb. 3.28 B). Im Western blot war neben dem prozessiertem GrB auch ein deutlicher Anteil an unprozessiertem MBP-fur-GrB mit einem GrB spezifischen mAk detektierbar (Abb. 3.28, offener Pfeil).

Dies deutet darauf hin, daß die fur-Sequenz, in der das Serin fehlt, keine optimale Erkennungssequenz mehr für das *Pichia* Furin-Homolog darstellt. Vergleichbare Ergebnisse wurden in dieser Arbeit auch mit anderen Expressionskonstrukten erzielt, in denen die MBP-Domäne durch eine irrelevante Proteindomäne ersetzt ist (Daten nicht gezeigt). Im Falle dieser Proteine war die enzymatische Aktivität des exprimierten GrB ebenfalls nur dann meßbar, wenn die verwendete Furin-Erkennungssequenz kein Serin N-terminal von GrB enthielt (Daten nicht gezeigt).

3.3.5 Zusammenfassung der Abschnitte 3.3.1 bis 3.3.4

In diesem Teil der Arbeit wurde ein Expressionssystem etabliert, in dem die stabilisierenden und Löslichkeit verbessernden Eigenschaften von MBP, das in *E. coli* im Kontext von Fusionsproteinen als Chaperon agiert, in *Pichia pastoris* genutzt wurden. Die Expression der Fusionsproteine MBP-furS-GrB

und MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ in *Pichia pastoris* lieferte um ein Vielfaches gesteigerte Proteinmengen im Vergleich zu Referenzkonstrukten, die in unfusionierter Form exprimiert wurden.

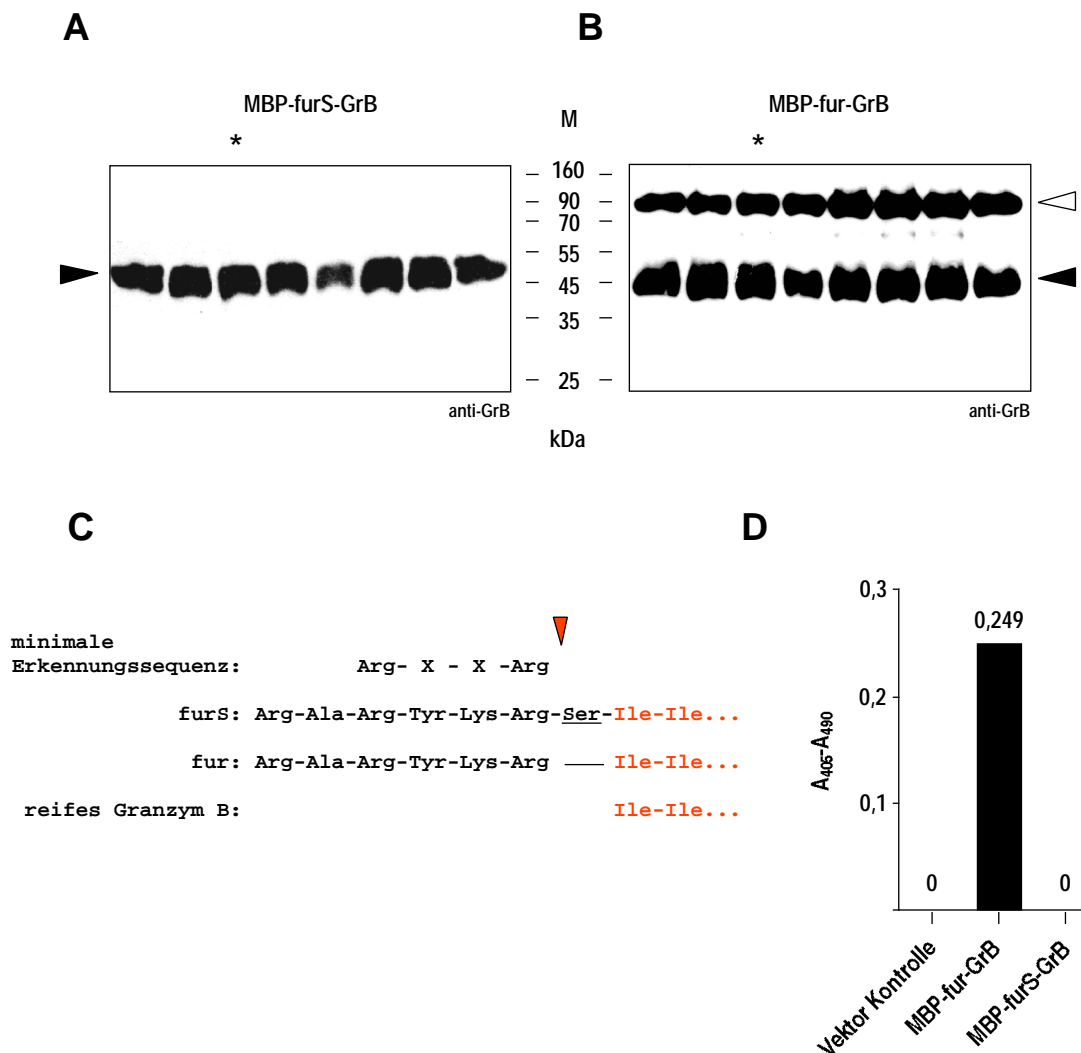


Abb. 3.28 | **Einfluß unterschiedlicher Furin-Erkennungssequenzen auf Prozessierung und enzymatische Aktivität von GrB Fusionsproteinen.** (A+B) Kulturüberstände verschiedener *Pichia pastoris* Expressionsklone transformiert mit pPIC9-MBP-furS-GrB (A) oder pPIC9-MBP-fur-GrB (B) wurden nach viertägiger Induktion im Western blot mit dem GrB spezifischen mAk 2C5 analysiert. Überstände der Klone, die mit einem Stern markiert sind, wurden für den nachfolgenden Enzymaktivitätsassay eingesetzt. (C) **Aminosäuresequenzen der verwendeten Furin-Spaltstellen.** Die in den Expressionskonstrukten pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-MBP-fur-GrB verwendeten Furin-Erkennungssequenzen (furS, fur) sowie die minimale Erkennungssequenz von Furin (minimale ES) sind im Dreibuchstabencode angegeben. Die Sequenz von reifem GrB beginnt mit Ile-Ile (rot). Die theoretische Spaltstelle, an der die Proteine im sekretorischen Weg der Hefe durch das Furin Homolog Kexin prozessiert werden, ist mit einem roten Pfeil markiert. (D) **Analyse der enzymatischen Aktivität von GrB in Kulturüberständen.** Die enzymatische Aktivität von GrB in Hefekulturüberständen der in A+B mit einem Stern markierten Hefeklone wurde in einem colorimetrischen Peptidspaltungsassay untersucht. Dazu wurden in einem Volumen von 100 µl 200 µM des Peptidsubstrat Ac-IETD-pNA für 4 h mit jeweils 20 µl Kulturüberstand inkubiert und entstehendes Spaltprodukt durch Messung der Absorption bei 405 nm quantifiziert. Kulturüberstand eines Hefeklons, der mit dem leeren Vektor pPIC9 transformiert war, diente als Kontrolle.

Durch Verwendung der Furin-Erkennungssequenz furS, die in den Expressionskonstrukten zwischen MBP und GrB bzw. ErbB2₁₋₂₂₂ Domäne eingefügt war, erfolgte eine vollständige Prozessierung der Fusionsproteine innerhalb dieser Sequenz. In Western blot Analysen war in Hefekulturüberständen ausschließlich prozessiertes GrB bzw. ErbB2₁₋₂₂₂ detektierbar.

Quantitative Analysen der mRNA Expression in Hefeklonen zeigten, daß die beobachteten starken Unterschiede bezüglich der Expression von GrB nicht mit den leicht unterschiedlichen GrB mRNA Niveaus korrelieren, was bedeutet, daß die MBP-furS Domäne auf Ebene der Translation oder posttranslational agiert. Die Analyse von Zellysaten des pPIC9-GrB Expressionsklons zeigte, daß GrB intrazellulär akkumuliert, und die Proteinsekretion durch diesen Klon nicht so effizient ist, wie durch Klone, die mit MBP-furS-GrB bzw. GST-furS-GrB transformiert waren. Obwohl MBP-furS-GrB in Hefekulturüberständen als vollständig prozessiertes Protein vorlag, wies es keinerlei enzymatische Aktivität auf. Deletion des Serins innerhalb der Furin-Erkennungssequenz führte zur Expression großer Mengen von enzymatisch aktivem GrB, das allerdings innerhalb der Furin-Erkennungssequenz nicht mehr vollständig gespalten wurde. Sehr wahrscheinlich hemmt das am N-Terminus von GrB verbleibende Serin der Furin-Erkennungssequenz die enzymatische Aktivität der Serinprotease. Aufgrund dieser Einschränkung von MBP-furS Fusionsproteinen, die sich bei der Expression von GrB ergibt, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter versucht, dieses Verfahren auch zur Steigerung der Ausbeute von GrB Fusionsproteinen zu verwenden.

Generell könnte dieses Expressionssystem allerdings dazu geeignet sein, um die Ausbeute rekombinanter Proteine bei der heterologen Expression in *Pichia pastoris* um ein Vielfaches zu steigern, sofern ein Serin am N-Terminus des herzustellenden Proteins tolerierbar ist. Weitere Daten, die im Rahmen dieser Arbeit sowie in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Weth in unserer Arbeitsgruppe erarbeitet wurden, deuten darauf hin, daß das hier entwickelte System auch bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* sowie in Säugerzellen zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung bei gleichzeitiger *in vivo* Prozessierung der MBP-Domäne führen kann (Daten nicht gezeigt).

3.4 AIF als Effektor in apoptoseinduzierenden Antikörperfusionsproteinen

Im Abschnitt 3.2 dieser Arbeit wurde die Serinprotease GrB als Effektor in Antikörper- und Wachstumsfaktorfusionsproteinen eingesetzt. Die Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T weisen eine hohe spezifische cytotoxische Aktivität gegenüber Zielzellen auf, die den jeweiligen Zielrezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Induktion von Apoptose durch GrB erfolgt durch die Aktivierung von Caspasen. Diese Aktivierung ist jedoch nicht zwingend erforderlich für die cytotoxische Aktivität. GrB induziert Apoptose an verschiedenen zentralen Punkten apoptotischer Signalkaskaden und umgeht damit die meisten Regulationsmechanismen, die in Tumorzellen dysreguliert sein können. Auch bei Inhibition oder

Inaktivierung von Caspasen durch Tumorzellen induziert GrB Apoptose in Caspasen unabhängiger Weise (vgl. 1.4.3).

Bei der klassischen Chemotherapie hingegen hängt die Effektivität einer antitumoralen Therapie auch von der Fähigkeit des verwendeten Cytostatikums ab, Caspasen zu aktivieren (Lockshin, 2004). Eine Konsequenz hiervon ist, daß die Inhibition oder Inaktivierung von Caspasen in Tumorzellen zur Therapieresistenz beiträgt (Faderl und Estrov, 2001; Fulda und Debatin, 2002; Svingen *et al.*, 2000).

Resistenz gegenüber Cytostatika wird z. B. durch verminderte Expression einzelner Caspasen durch Tumorzellen vermittelt (Estrov *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2001a; Fulda *et al.*, 2001b; Koomagi und Volm, 2000; Teitz *et al.*, 2000). MCF-7 Mammakarzinomzellen beispielsweise sind Caspase-3 defizient, da sie eine Mutation im Exon 3 des Caspase-3 Gens tragen, die zu einem Rasterschub führt (Janicke *et al.*, 1998). MCF-7 Zellen können durch Transfektion mit Procaspase-3 gegenüber Cytostatika sensitiviert werden (Yang *et al.*, 2001). Eine verminderte Expression von Caspasen kann durch epigenetische Änderungen z. B. durch Promotorhypermethylierung hervorgerufen werden (Teitz *et al.*, 2000). Hypermethylierung regulatorischer Sequenzen des Caspase-8 Gens führen in verschiedenen Tumoren zur Inaktivierung der Caspase-8 (Fulda *et al.*, 2001a; Fulda *et al.*, 2001b; Teitz *et al.*, 2000). Auch hier bewirkte das Wiederherstellen der Caspase-8 Expression durch Gentransfer oder durch demethylierende Therapie eine Sensitivierung der Tumorzellen gegenüber todesrezeptor- oder cytostatikainduzierter Apoptose (Fulda *et al.*, 2001a; Fulda *et al.*, 2001b).

Neben GrB, das auch auf caspasenunabhängigen Wegen Apoptose initiieren kann, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternativer Effektor in Antikörperfusionsproteinen verwendet, der nach bisherigem Kenntnisstand die Dysregulation apoptotischer Signalwege auf Ebene der Caspasen umgehen können sollte. Hierzu wurde der „apoptosis inducing factor“ (AIF) als alternativer Apoptoseinduktor eingesetzt (vgl. 1.3.3). AIF ist ein Flavoprotein mit NADH-Oxidase-Aktivität, das als 67 kDa Protein mit einem N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssignal synthetisiert wird. Dieses wird nach dem Import in den Intermembranraum der Mitochondrien abgespalten (Susin *et al.*, 1999). In gesunden Zellen ist reifes AIF (57 kDa) in den Mitochondrien lokalisiert, wo es vermutlich als Oxidoreduktase wirkt (Miramar *et al.*, 2001). Die Freisetzung von AIF aus dem Intermembranraum von Mitochondrien und die Translokation in den Zellkern führt zur Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung, die unabhängig von der Aktivierung von Caspasen geschieht. Die molekularen Mechanismen der AIF vermittelten DNA-Fragmentierung sind nicht bekannt. Bindung von AIF an die chromosomale DNA ist aber für die apoptotische Aktivität erforderlich (Ye *et al.*, 2002). Cytosolisches AIF bewirkt die Freisetzung weiterer AIF-Moleküle und weiterer proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom *c* aus den Mitochondrien (Susin *et al.*, 1999). Neben der Apoptoseinduktion durch Schädigung der nukleären DNA, wirkt AIF also offensichtlich auch als proapoptotisches Signalmolekül im Cytosol. Daher erscheint bei dem hier verfolgten Ansatz des selektiven Einbringens von AIF in das Cytoplasma durch Antikörperfusionsproteine eine Signalverstärkung durch Translokation weiterer AIF Moleküle aus den Mitochondrien möglich. Diese cytosolische Aktivität von AIF ist allerdings abhängig von einem

weiteren, bisher unbekannten cytosolischen Faktor. So führte die Inkubation von isolierten Rattenmitochondrien mit rekombinantem AIF und Cytosol zur Freisetzung und Aktivierung von Caspase-9 und Cytochrom *c*. In Abwesenheit von Cytosol hingegen erfolgte keine AIF induzierte Freisetzung dieser Proteine (Susin *et al.*, 1999).

Da bisher nur wenig über die Rolle von AIF in apoptotischen Signalwegen bekannt ist, könnte die Charakterisierung von AIF Antikörperfusionsproteinen zum selektiven Einschleusen von AIF in Tumorzellen auch zu neuen Erkenntnissen über die Wirkungsweise und den Mechanismus der AIF vermittelten Induktion von Apoptose führen.

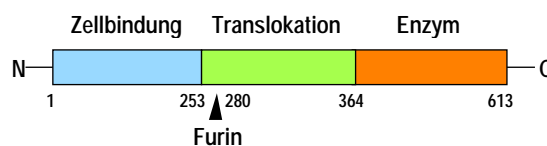
3.4.1 Fusionsproteine zum selektiven Einschleusen von AIF in das Cytoplasma von Tumorzellen

Der „apoptosis inducing factor“ (AIF) wird ubiquitär exprimiert und ist in nicht-apoptotischen Zellen im mitochondrialen Intermembranraum lokalisiert. Durch Konstruktion von Deletionsmutanten konnten drei funktionelle Domänen des AIF identifiziert werden (Abb. 3.31 A). Wildtyp AIF besteht aus einem N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssignal (MLS, Aminosäuren 1-100), einer Linkerregion (Aminosäuren 101-120) und einer Oxidoreduktasedomäne (Aminosäuren 121-612) (Susin *et al.*, 1999). Diese enthält auch die basischen Seitenketten, die an DNA-Bindung (Ye *et al.*, 2002) und HSP70-Bindung beteiligt sind (Gurbuxani *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2003). Zudem sind Bereiche in dieser Domäne enthalten, die den nukleären Import von cytosolischem AIF vermitteln (NLS). Überexpression des ATP abhängigen Chaperons HSP70 durch Tumorzellen verstärkt deren tumorigenes Potential (Jaattela, 1995). Die anti-apoptotische Aktivität von HSP70 basiert auf der Interaktion mit Apaf-1, wodurch die Rekrutierung von Procaspase-9 zum „apoptosome“ inhibiert wird (Beere *et al.*, 2000). Außerdem wird durch die Bindung von HSP70 an cytosolisches AIF dessen nukleärer Import blockiert (Gurbuxani *et al.*, 2003). Herunterregulation von HSP70 durch eine Antisensestrategie erhöht die Sensitivität von Zellen gegenüber AIF induzierter Apoptose (Ravagnan *et al.*, 2001). Die Aminosäureseitenketten von AIF, die für die Bindung von HSP70 verantwortlich sind, wurden identifiziert (R192, K194). Eine AIF Punktmutante, bei der diese beiden basischen Aminosäuren jeweils gegen Alanin ausgetauscht sind (R192A, K194A), wurde schneller in den Zellkern importiert und besaß eine höhere apoptotische Aktivität (Gurbuxani *et al.*, 2003). Diese „gain of function“ Mutation wurde in ein hier abgeleitetes AIF-Antikörperfusionsprotein ebenfalls eingeführt (siehe unten).

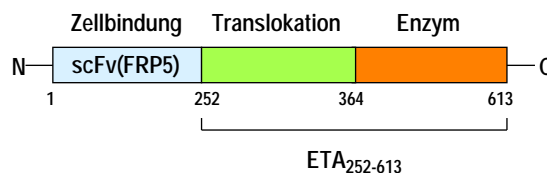
AIF-Deletionsmutanten, bei denen das mitochondriale Lokalisationssignal (AIF_{Δ1-100}) oder zusätzlich die Linkerregion (AIF_{Δ1-120}) entfernt sind, induzieren trotz dieser Mutationen DNA-Fragmentierung und Chromatinkondensation in isolierten HeLa Zellkernen (Susin *et al.*, 1999). Da diese Deletionsmutanten für die apoptotische Aktivität von AIF ausreichend sind, wurden in dieser Arbeit nur solche verkürzten AIF-Varianten als Effektoren in Antikörperfusionsproteinen eingesetzt. Als tumorzell-spezifische Zellbindungsdomäne wurde wie zuvor das ErbB2 spezifische scFv(FRP5) Antikörperfragment genutzt. In den vorherigen Abschnitten ist gezeigt, daß das ErbB2 spezifische Fusionsprotein GrB-5 nach der rezeptorvermittelten zellulären Aufnahme im endosomalen Kompartiment lokalisiert ist

und aus diesem freigesetzt werden muß, um Zugang zu cytosolischen Substraten zu erlangen. Um diese Translokation zu ermöglichen, wurde das endosomolytische Reagenz Chloroquin eingesetzt. Zur Induktion von Apoptose muß AIF in das Cytosol bzw. in den Zellkern gelangen, um die Freisetzung proapoptotischer Moleküle aus den Mitochondrien bzw. die Fragmentierung der chromosomalen DNA zu vermitteln. Daher ist für den hier verfolgten Ansatz der selektiven Induktion von Apoptose durch AIF-Antikörperfusionsproteine nach Zellbindung und Internalisierung sehr wahrscheinlich ebenfalls eine Translokation der AIF-Domäne aus dem endosomalen Kompartiment in das Cytosol erforderlich. Durch die endogenen Kernlokalisierungssignale sollte AIF dann aus dem Cytosol in den Zellkern importiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Einfügen einer bakteriellen Translokationsdomäne in AIF-Antikörperfusionsproteine die Freisetzung von AIF aus dem endosomalen Kompartiment in das Cytosol vermitteln kann. Hierzu wurde die Translokationsdomäne des Exotoxin A aus *Pseudomonas aeruginosa* (ETAII, Aminosäuren 252-366) eingesetzt (Abb. 3.29)

A Exotoxin A



B scFv(FRP5)-ETA Immuntoxin



C AIF-Konstrukte

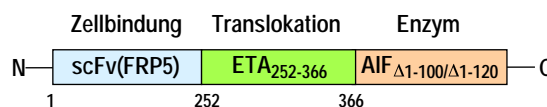


Abb. 3.29 | **Schematischer Aufbau Immuntoxin-ähnlicher Fusionsproteine.** (A) Untereinheitenstruktur von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A. (B) Schematischer Aufbau des ErbB2 spezifischen Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA, abgeleitet von Exotoxin A (Wels *et al.*, 1992). Die Zellbindungsdomäne ist hier gegen das ErbB2 spezifische scFv(FRP5) Antikörperfragment ausgetauscht. (C) Das AIF Fusionsprotein basiert auf dem Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA, enthält jedoch AIF als proapoptotische Effektordomäne.

Für die Konstruktion der AIF-Antikörperfusionsproteine wurde der Bauplan des bakteriellen Exotoxin A

zu Grunde gelegt (vgl. 1.5.3). Die Domänenstruktur dieses Toxins sowie der hier konstruierten AIF Fusionsproteine ist in Abb. 3.29 schematisch dargestellt. Exotoxin A besteht aus drei funktionellen Domänen, die für die Zellbindung, Translokation aus dem Endosom ins Cytosol und für die cytotoxische Aktivität verantwortlich sind (Hwang *et al.*, 1987). Über die Zellbindungsdomäne bindet Exotoxin A an den α 2-Makroglobulinrezeptor auf der Oberfläche von Zellen und wird über rezeptorvermittelte Endocytose in diese aufgenommen (Kounnas *et al.*, 1992). Im Endosom bewirkt das saure Milieu eine Konformationsänderung innerhalb der Translokationsdomäne, die die Abspaltung der Zellbindungsdomäne durch die endosomale Protease Furin erlaubt (Gordon *et al.*, 1995). Nach Reduktion einer Disulfidbrücke und retrogradem Transport über Golgi Apparat und endoplasmatisches Retikulum wird die katalytische Domäne des Exotoxin A in das Cytosol transloziert. Dort inaktiviert seine ADP-Ribosyltransferase-Aktivität den Elongationsfaktor 2 und inhibiert so die Proteinbiosynthese (Morimoto und Bonavida, 1992). Die hohe cytotoxische Aktivität des Exotoxin A wurde in Form von Immuntoxinen für therapeutische Zwecke nutzbar gemacht (Pastan, 2003). Hierzu wurde die Zellbindungsdomäne des Exotoxin A gegen Antikörperfragmente ausgetauscht, die an tumorassoziierte Antigene binden (Abb. 3.29 B). Der Einsatz von Immuntoxinen für therapeutische Zwecke wird jedoch durch die Induktion neutralisierender Antikörper limitiert (Azemar *et al.*, 2003). Dies ist auf den bakteriellen Ursprung des Toxinanteils dieser Moleküle zurückzuführen. Ein großer Teil des Toxins ist in den hier konstruierten AIF-Antikörperfusionsproteinen durch die proapoptotische und potentiell cytotoxisch aktive AIF Domäne ausgetauscht. Da dieser Anteil humanen Ursprungs ist, können AIF-Antikörperfusionsproteine also im Prinzip als wenigstens teilweise „humanisierte Immuntoxine“ bezeichnet werden.

3.4.2 Konstruktion, bakterielle Expression und Reinigung rekombinanter AIF-Antikörperfusionsproteine

Zur Konstruktion von AIF-Antikörperfusionsproteinen wurde die cDNA des AIF mit den spezifischen Oligonukleotidprimern 5'*SalI*-AIF und 3'*EcoRI*-AIF mittels RT-PCR aus Makrophagen Gesamt-RNA amplifiziert. Das Amplifikat wurde in die *EcoRI* und *SalI* Restriktionsschnittstellen des Plasmids pBIIKS (Stratagene) inseriert. Dieses Plasmid diente bei der Amplifikation der verkürzten AIF-Mutanten AIF _{Δ 1-100} und AIF _{Δ 1-120} als „template“. In diesen Reaktionen wurden die Oligonukleotidprimer 5'*KpnI*-AIF _{Δ 1-100} bzw. 5'*KpnI*-AIF _{Δ 1-120} und 3'*EcoRI*-AIF verwendet. Die resultierenden PCR Fragmente wurden in die *KpnI* und *EcoRI* Restriktionsschnittstellen von pBIIKS inseriert.

Zur Konstruktion bakterieller Expressionsvektoren wurden die bereits vorhandenen Expressionsplasmide pJF50-scFv(FRP5)-E2C und pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-E2C verwendet (Sloots, 2004). Diese Plasmide kodieren für ein N-terminales *ompA* Periplasma-Sekretionssignal, gefolgt von einem FLAG-tag und einem Hexahistidin-tag (*NdeI/HindIII* Fragment). Zudem kodieren sie für das ErbB2 spezifische scFv(FRP5) Antikörperfragment (*HindIII/XbaI* Fragment), gefolgt von einer synthetischen DNA-bindenden Domäne (E2C) (*KpnI/EcoRI* Fragment).

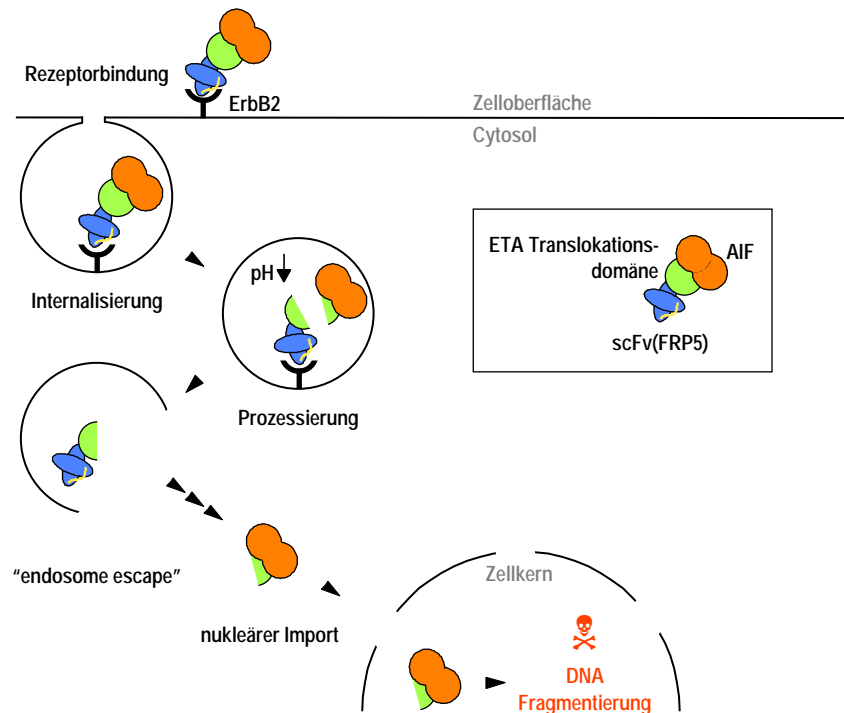


Abb. 3.30 | **Hypothetisches Modell der Funktionsweise von AIF Fusionsproteinen.** Das Fusionsprotein bindet über das scFv(FRP5) Antikörperfragment spezifisch an ErbB2 auf der Zelloberfläche. Nach Aufnahme in die Zelle durch rezeptorvermittelte Endocytose erfolgt durch Ansäuerung eine Konformationsänderung sowie die Spaltung des Fusionsproteins innerhalb der Translokationsdomäne, die durch die endosomale Protease Furin katalysiert wird. Ein retrograder Transportmechanismus über den Golgi Apparat und das endosomale Retikulum resultiert in der Freisetzung der AIF-Domäne in das Cytosol. AIF besitzt zwei Kernlokalisierungssignale, die den nukleären Import von cytosolischem AIF bewirken. Nukleäres AIF führt zur Fragmentierung der chromosomalen DNA und induziert so den apoptotischen Zelltod. (Weitere Erläuterungen im Text.)

Das Plasmid pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-E2C enthält zusätzlich die Translokationsdomäne des Exotoxin A (ETAII) (*SalI/KpnI* Fragment). Die Sequenz des E2C wurde aus den beiden Expressionsplasmiden durch Restriktionsverdau mit *KpnI* und *EcoRI* entfernt und durch die AIF-PCR-Fragmente AIF_{Δ1-100} und AIF_{Δ1-120} ersetzt. Die resultierenden Expressionsplasmide pJF50-scFv(FRP5)-AIF_{Δ1-100}, pJF50-scFv(FRP5)-AIF_{Δ1-120}, pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-AIF_{Δ1-100} und pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-AIF_{Δ1-120} wurden zur Expression der AIF-Antikörperfusionsproteine in *E. coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIL transformiert. Expressionskulturen wurden in Gegenwart von 0,8 % Glucose kultiviert, um den *tac*-Promotor zu reprimieren, der die Expression der Fusionsproteine steuert. Die Induktion der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe von IPTG. Die Analyse der Expressionskulturen zeigte, daß die AIF Fusionsproteine hauptsächlich als unlösliche Proteine in Form von Proteinaggregaten („inclusion bodies“) vorhanden waren (Daten nicht gezeigt). Dabei wurden die Fusionsproteine, in denen die AIF-Linkersequenz (Aminosäuren 101-120) vorhanden war (pJF50-scFv(FRP5)-AIF_{Δ1-100} und pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-AIF_{Δ1-100}), deutlich besser exprimiert, als die Fusionsproteine, denen der Linker fehlte (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grunde wurde im Folgenden mit den Klonen weitergearbeitet,

die mit pJF50-scFv(FRP5)-AIF_{Δ1-100} und pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-AIF_{Δ1-100} transformiert waren. Die Expressionskonstrukte, die zur Expression der AIF-Antikörperfusionsproteine verwendet wurden, sind schematisch in Abb. 3.31 B dargestellt.

Gesamtzellextrakte der Expressionskulturen wurden mit 8 M Harnstoff enthaltendem Puffer hergestellt und Fusionsproteine daraus unter denaturierenden Bedingungen durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Eluatsfraktionen wurden auf eine Proteinkonzentration kleiner 10 µg/ml verdünnt, um das Ausbilden intermolekularer Disulfidbrücken zu minimieren, und gereinigte Fusionsproteine wurden ohne vorherige Reduktion renaturiert (vgl. 2.2.15). Die gereinigten und renaturierten AIF Fusionsproteine werden im Folgenden mit 5-AIF bzw. mit 5-E-AIF bezeichnet. Die Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung (Abb. 3.31 D) und im Western blot (Abb. 3.31 C) mit einem AIF spezifischen Antiserum analysiert.

Die „gain of function“ AIF Mutante, bei der die beiden basischen Aminosäuren R192 und K194, die Kontakt zu HSP70 aufnehmen, jeweils gegen Alanin ausgetauscht sind, wurde in einer PCR-Strategie hergestellt. Hierzu wurden die beiden antiparallelen Primer AIF-R192A/K194A-sense und AIF-R192A/K194A-antisense verwendet, die die R192A/K194A Mutationen einführen. Die Primer wurden so gewählt, daß die gewünschte Mutation „mismatch“ von mit der Matrize komplementären Bereichen umgeben war und das Plasmid vollständig amplifiziert wurde. Das Plasmid pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-AIF_{Δ1-100} diente bei der Reaktion als „template“. Das mutierte Konstrukt pJF50-scFv(FRP5)-ETAII-AIF_{Δ1-100, R192A/K194A} wurde ebenfalls in *E. coli* transformiert, und das resultierende Protein 5-E-AIF_{R192A/K194A} wurde wie oben beschrieben gereinigt und renaturiert.

3.4.3 Funktionelle Charakterisierung von AIF-Antikörperfusionsproteinen

AIF weist auf der Oberfläche ein positives elektrostatisches Potential auf, der berechnete isoelektrische Punkt von reifem AIF (AIF_{Δ1-100}) ist jedoch eher neutral (pH_i=6,5) (Ye *et al.*, 2002). In Abb. 3.32 A sind basische Aminosäuren markiert, die zu dem positiven elektrostatischen Potential beitragen und an der sequenzunspezifischen DNA-Bindung von AIF beteiligt sind. AIF-Mutanten, in denen diese basischen Aminosäuren gegen ungeladene ausgetauscht sind, zeigten in elektrophoretischen Mobilitätsshiftassays geringere oder gar keine DNA-Bindung mehr (Ye *et al.*, 2002). In Transfektionsexperimenten induzierten diese Mutanten im geringeren Maße Apoptose oder besaßen gar kein proapoptotisches Potential. Dies zeigt, daß die Bindung von AIF an DNA eine Grundvoraussetzung für seine proapoptotische Aktivität ist. Die Fähigkeit von AIF, an DNA zu binden, wurde hier genutzt, um die hergestellten Fusionsproteine funktionell zu charakterisieren. Hierzu wurde ein elektrophoretischer Mobilitätsshiftassay durchgeführt. Unterschiedliche Konzentrationen der AIF Fusionsproteine wurden mit 2,5 µg DNA Marker (1 kb DNA Ladder, Gibco) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert, mit DNA-Ladepuffer versetzt und im Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Ein Ansatz ohne Protein diente als Kontrolle.

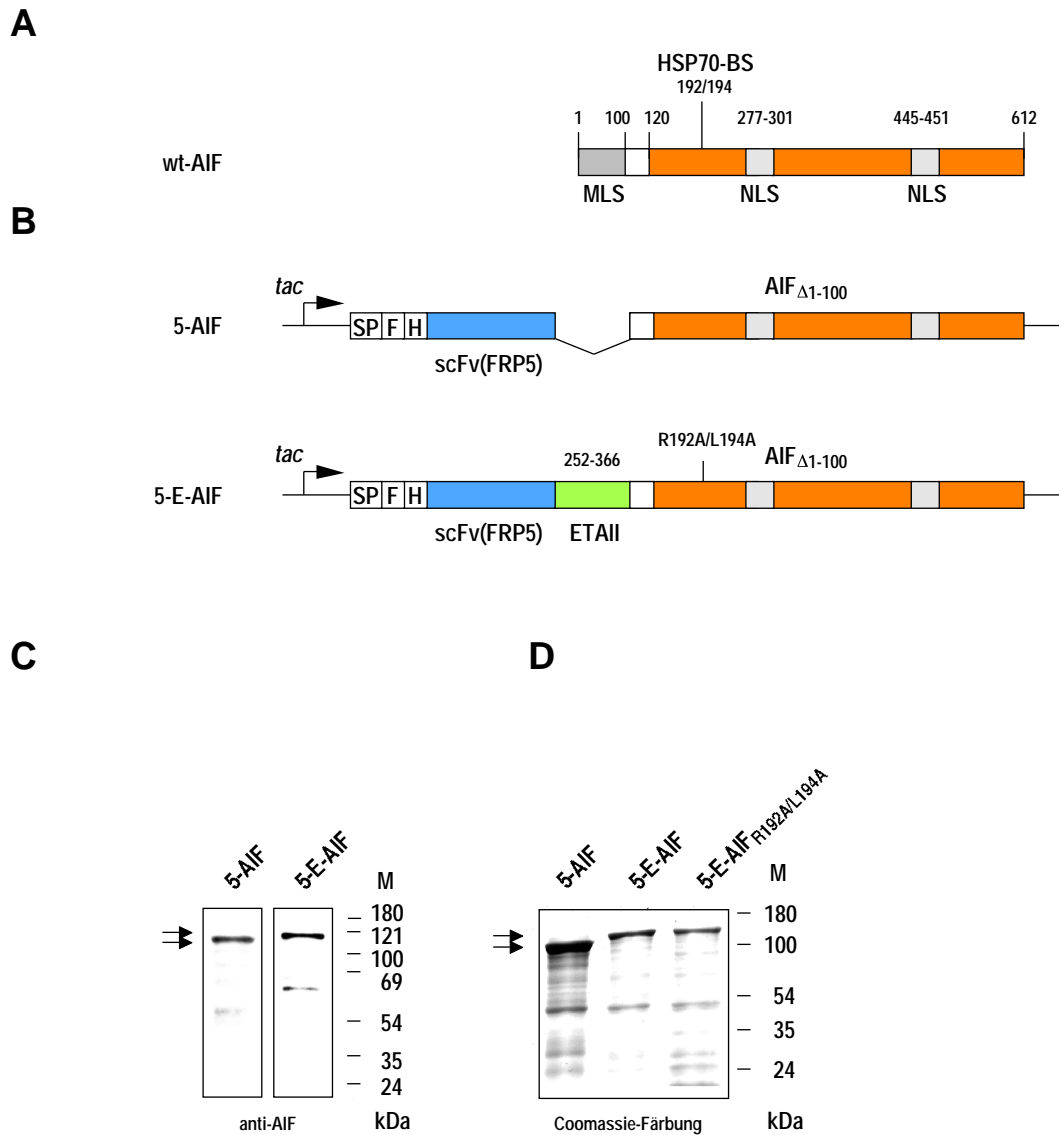


Abb. 3.31 | **Expression und Reinigung von AIF Fusionsproteinen.** (A) **Untereinheitenstruktur von Wildtyp AIF.** AIF wird mit einem N-terminalen mitochondrialen Lokalisationssignal (MLS, Aminosäuren 1-100) synthetisiert, das nach dem Import in den mitochondrialen Inter-membranraum abgespalten wird. Zusätzlich besitzt AIF eine Linkersequenz (Aminosäuren 101-120) und eine Oxidoreduktase-Domäne (Aminosäuren 121-612), die auch die Bereiche enthält, die für die proapoptotische Aktivität erforderlich sind. Schematisch sind die Positionen der Kernlokalisierungssignale (NLS, Aminosäuren 277-301 und 445-451) sowie der HSP70-Bindungsstelle (HSP70-BS, Aminosäuren 192 und 194) angegeben. (B) **Schematische Darstellung der Konstrukte zur Expression von 5-AIF, 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/L194A}.** In den bakteriellen Expressionsplasmiden ist die Sequenz, die für AIF Δ 1-100 kodiert, am 5' Ende mit der Sequenz des ErbB2 spezifischen scFv(FRP5) fusioniert. Die Proteine 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/L194A} enthalten zusätzlich die Translokationsdomäne von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (ETaII, Aminosäuren 252-366). Alle Konstrukte kodieren zusätzlich für ein N-terminales *ompA* Periplasma-Sekretionssignal (SP) sowie für einen FLAG-tag (F) und einen Hexahistidin-tag (H). (C+D) **Immunoblot Analysen (C) und Coomassie gefärbtes SDS Gel (D) der gereinigten AIF Fusionsproteine.** 5-AIF und 5-E-AIF wurden in *E. coli* exprimiert, denaturiert, durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und renaturiert. Gereinigte und renaturierte Proteine wurden durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (D) bzw. im Immunoblot (C) mit einem AIF spezifischen Antiserum analysiert. Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert. Daneben enthielten die gewonnenen Proteinfractionen zusätzliche Banden, die sehr wahrscheinlich Degradationsprodukte darstellen.

Wie in (Abb. 3.32 B) dargestellt, war mit zunehmender Proteinmenge eine Gelretardation des DNA Markers zu beobachten. Dies deutet auf die Bildung weniger stark geladener Protein/DNA Komplexe hin. Bei höheren Proteinkonzentrationen lagen alle DNA Fragmente in Form elektroneutraler Komplexe mit den AIF-Fusionsproteinen 5-AIF bzw. 5-E-AIF vor, die keine elektrophoretische Mobilität mehr besaßen.

Über das scFv Antikörperfragment sollten AIF Fusionsproteine spezifisch an ErbB2 auf der Oberfläche von Zellen binden. Um dies zu untersuchen, wurden durchflußcytometrische Analysen mit ErbB2 negativen Renca-lacZ und ErbB2 positiven Renca-lacZ/ErbB2 Zellen durchgeführt (vgl. 3.1.2). Die Zellen wurden mit 5-AIF bzw. 5-E-AIF inkubiert, und gebundene Fusionsproteine wurden mit dem mAk M2 anti-FLAG sowie mit PE-markiertem anti-Maus IgG detektiert. Wie in Abb. 3.32 C gezeigt, banden die AIF Fusionsproteine an ErbB2 exprimierende Renca-lacZ/ErbB2 Zellen, wohingegen eine deutlich reduzierte Bindung an parentale Renca-lacZ Zellen detektierbar war.

Diese Daten zeigen, daß sowohl die Antikörperdomäne als auch die AIF-Domäne der renaturierten AIF Fusionsproteine hinsichtlich ihrer Bindung von ErbB2 bzw. DNA funktional waren. Eine weitere Grundvoraussetzung für den hier verfolgten Ansatz der selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen durch AIF-Antikörperfusionsproteine stellt die Aufnahme der Proteine in das Cytoplasma der Zielzellen dar. Um eine potentielle Internalisierung der Fusionsproteine zu untersuchen, wurden immunfluoreszenzmikroskopische Experimente mit ErbB2 exprimierenden humanen A-431 Vulvakarzinomzellen durchgeführt. Die Zellen wurden auf Objektträgern ausgesät und für 1 h mit den AIF Fusionsproteinen inkubiert. Nach dem Waschen der Zellen wurden sie für weitere 1,5 h inkubiert, fixiert, permeabilisiert und aufgenommene AIF Fusionsproteine wurden mit dem mAk M2 anti-FLAG und einem Alexa488 gekoppelten Zweitantikörper detektiert. Die Zellkerne wurden mit Propidiumiodid rot angefärbt. Die Analyse der Präparate erfolgte in einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (Leica).

Wie in Abb. 3.32 D dargestellt, konnten die AIF Fusionsproteine 5-AIF und 5-E-AIF nach 2,5 h in den Zellen nachgewiesen werden. Eine Oberflächenfärbung war nach dieser Zeit nicht mehr detektierbar. Dies zeigt, daß gebundene Proteine vollständig in das Cytoplasma der Zielzellen aufgenommen wurden. Die inhomogene punktuelle Färbung der internalisierten Fusionsproteine läßt, wie im Fall der GrB Fusionsproteine (vgl. 3.2.6), auf eine Lokalisation in membranumschlossenen Vesikeln schließen. Hier ist jedoch einschränkend anzumerken, daß anhand dieser mikroskopischen Analysen keine Aussage über die Lokalisation der AIF Domäne gemacht werden kann, da der zur Detektion der AIF Fusionsproteine verwendete mAk M2 das FLAG Epitop am N-Terminus des scFv(FRP5) erkennt. Bei korrekter Funktionsweise der im Protein 5-E-AIF enthaltenen Exotoxin A Translokationsdomäne sollte im endosomalen Kompartiment eine Spaltung dieser Domäne durch die Protease Furin erfolgen, die scFv(FRP5) und die AIF Domäne voneinander trennen würde. Nach der Spaltung läßt die Detektion der scFv Domäne daher keine Aussage über die Lokalisation der AIF Domäne zu. Um eine potentielle Kernlokalisation der AIF-Domäne zu untersuchen, ist ein AIF spezifischer Antikörper notwendig.

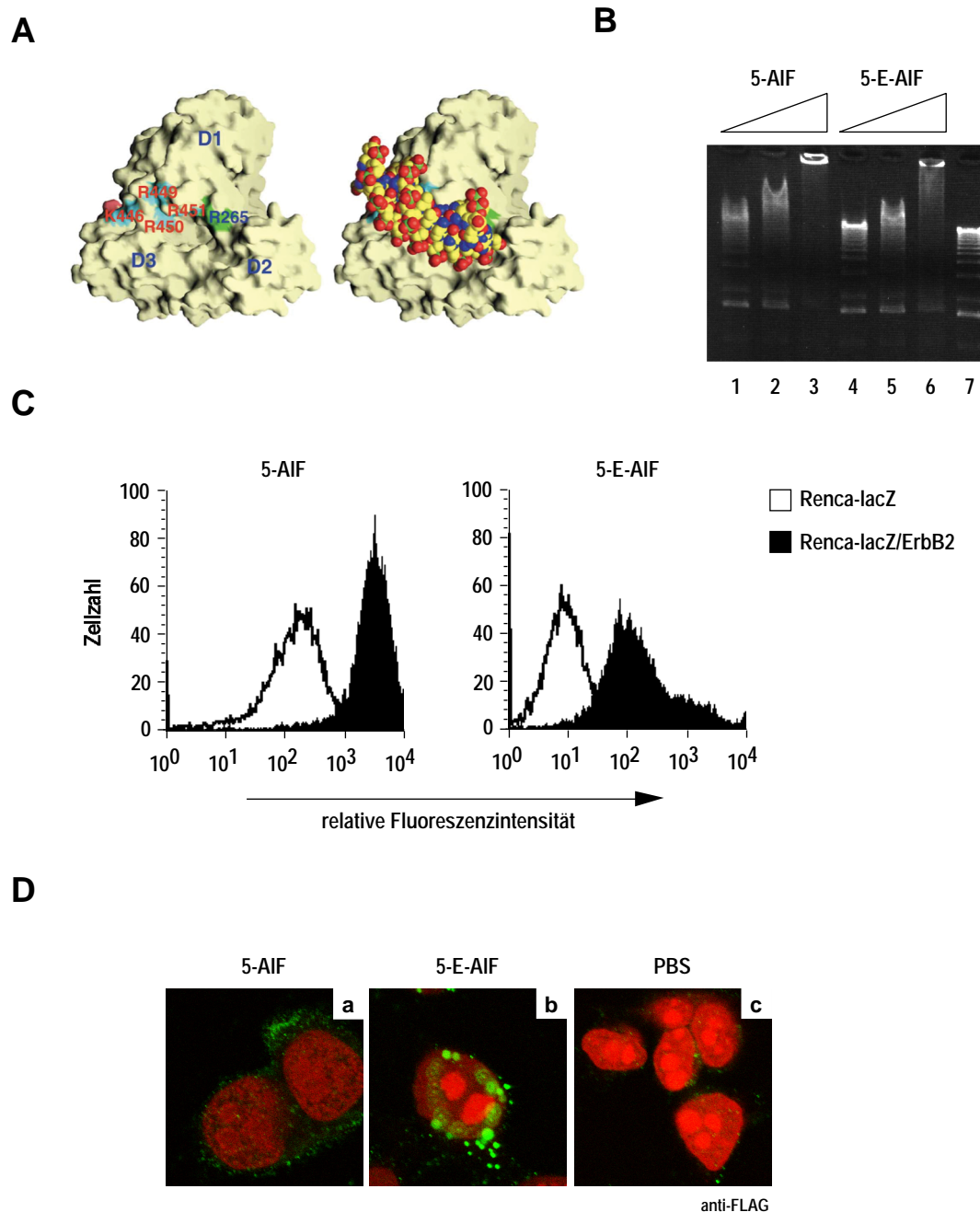


Abb. 3.32 | **(A) Struktur von AIF.** Darstellung der an der DNA-Bindung beteiligten basischen Aminosäuren auf der Oberfläche des AIF (links). Berechnete Struktur einer 12 bp DNA-Doppelhelix, die mit den zuvor markierten Aminosäureseitenketten interagiert (rechts). Abbildungen aus: (Ye *et al.*, 2002). **(B) Analyse der DNA-Bindungseigenschaften von AIF Fusionsproteinen.** 2,5 µg DNA-Marker wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen der AIF Fusionsproteine 5-AIF bzw. 5-E-AIF oder ohne Protein (Spur 7) inkubiert und im 1 %igen Agarosegel auf ihre elektrophoretische Mobilität untersucht. Die DNA wurde mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht analysiert. **(C+D) Analyse der Bindungs- und Internalisierungseigenschaften von AIF Fusionsproteinen.** **(C)** Renca-lacZ und Renca-lacZ/ErbB2 Zellen wurden in durchflußcytometrischen Studien verwendet, um die Bindung von 5-AIF und 5-E-AIF an ErbB2 zu untersuchen. Gebundene Proteine wurden mit dem mAk M2 und PE-konjugiertem anti-Maus IgG detektiert. **(D) Internalisierung von AIF Fusionsproteinen in ErbB2 exprimierenden Zellen.** A-431 Zellen wurden auf Objektträgern kultiviert und für 1 h bei 37 °C mit 5-AIF (a), 5-E-AIF (b) oder ohne Protein (c) inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen und für weitere 1,5 h bei 37 °C kultiviert und danach fixiert und permeabilisiert. Internalisierte AIF Fusionsproteine wurden mit dem mAk M2 und Alexa488-gekoppeltem anti-Maus IgG detektiert. Die Analyse der Präparate erfolgte mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie.

Mikroskopische Analysen die mit dem AIF spezifischen Ziegen-Antiserum D-20 (Santa Cruz) durchgeführt wurden, führten jedoch zu keiner Färbung der AIF Fusionsproteine in A-431 Zellen (Daten nicht gezeigt). Endogenes AIF konnte hierbei jedoch auch nicht detektiert werden, was auf ein methodisches Problem hindeutet. Weitere AIF spezifische Antikörper standen zu diesem Zeitpunkt aber nicht zur Verfügung.

3.4.4 Cytotoxische Aktivität von AIF-Antikörperfusionsproteinen

Die cytotoxische Aktivität der AIF Fusionsproteine wurde in MTT-Metabolisierungsassays untersucht. ErbB2 exprimierende A-431 Vulvakarzinomzellen wurden mit 5-AIF, 5-E-AIF oder 5-E-AIF_{R192A/K194A} in Gegenwart oder Abwesenheit von Chloroquin behandelt (Abb. 3.33). Die Überlebensrate der Zellen, relativ zu Zellen, die nur mit Chloroquin behandelt waren, wurde nach 3 Tagen durch Zugabe von MTT und Messung der Absorption bei 590 nm bestimmt (Abb. 3.33, schwarze Balken). Daneben sind die Ergebnisse der Ansätze ohne Zugabe von Chloroquin dargestellt (Abb. 3.33, weiße Balken). In äquimolaren Konzentrationen eingesetztes Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA diente als Kontrolle (Wels *et al.*, 1992).

Die cytotoxische Aktivität von scFv(FRP5)-ETA wurde durch Zugabe von Chloroquin erwartungsgemäß leicht reduziert (Abb. 3.33), da Chloroquin als schwache Base die Ansäuerung der Endosomen verhindert. Eine Ansäuerung ist aber für die Funktionalität der bakteriellen Translokationsdomäne erforderlich.

Die in den Cytotoxizitätsassays erhaltenen Daten zeigen, daß A-431 Zellen durch die AIF Fusionsproteine 5-E-AIF bzw. 5-E-AIF_{R192A/K194A} in Gegenwart von Chloroquin effizient abgetötet wurden. Dabei war die cytotoxische Aktivität vergleichbar mit der des Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA. Die AIF-Mutante 5-E-AIF_{R192A, K194A}, bei der die HSP70-Bindungsstelle durch zwei Punktmutationen modifiziert ist, zeigte in den hier durchgeführten Metabolisierungsassays keine höhere Effizienz als nicht mutiertes 5-E-AIF. Das AIF Fusionsprotein 5-E-AIF, das keine Translokationsdomäne besitzt, zeigte auch in Gegenwart von Chloroquin keine cytotoxische Aktivität.

Die Ergebnisse dieser Metabolisierungsassays weisen darauf hin, daß die bakterielle Translokationsdomäne für die cytotoxische Aktivität der AIF Fusionsproteine erforderlich ist, für die Translokation von AIF in das Cytosol aber nicht ausreicht. Hierfür wird zusätzlich das endosomolytische Reagenz Chloroquin benötigt. Chloroquin wurde in diesem Metabolisierungsassay in einer Konzentration (100 µM) verwendet, die für die cytosolische Translokation des GrB-5 Fusionsproteins ausreichend war (vgl. 3.2.7). Das AIF Fusionsprotein 5-AIF zeigte jedoch, im Gegensatz zu GrB-5, auch in Gegenwart von Chloroquin keinen cytotoxischen Effekt.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß Chloroquin zwar die Translokation von 5-AIF in das Cytosol bewirken könnte, cytosolisches 5-AIF aber keine proapoptotische Aktivität besitzt. Im Gegensatz hierzu sind beide AIF Fusionsproteine, die die bakterielle Translokationsdomäne enthalten, cytotoxisch aktiv. Wie oben beschrieben, wird das Wildtyp Exotoxin A nach der Internalisierung innerhalb der

Translokationsdomäne gespalten. Für die nachfolgende Translokation der katalytischen Domäne des Exotoxin A vom endosomalen Kompartiment in das Cytosol ist jedoch zusätzlich ein C-terminales ER-Retentionssignal erforderlich (Chaudhary *et al.*, 1990), welches als intrazelluläres „targeting“-Signal fungiert und in der Zielzelle einen retrograden Toxintransport über den Golgi Apparat und das endoplasmatische Retikulum ermöglicht.

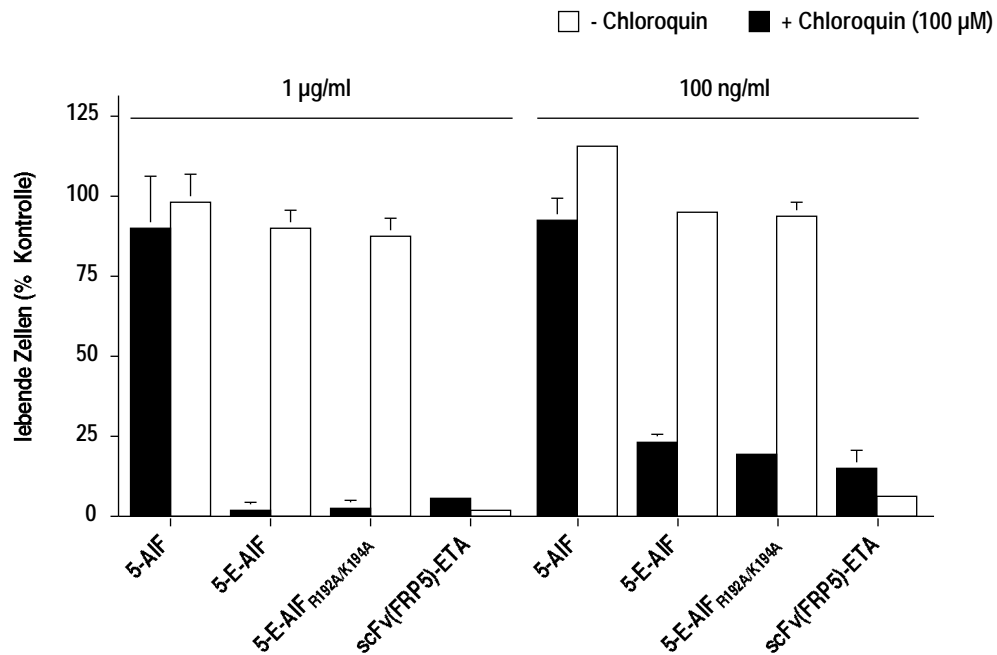


Abb. 3.33 | **Cytotoxische Aktivität von AIF Fusionsproteinen.** Die cytotoxische Aktivität von 5-AIF, 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/K194A} gegenüber ErbB2 exprimierenden A-431 Zellen wurde in MTT-Metabolisierungsassays analysiert. Die Zellen wurden in Mikrotiterplatten ausgesät und mit 100 ng/ml oder 1 µg/ml 5-AIF, 5-E-AIF oder 5-E-AIF_{R192A/K194A} in Gegenwart (schwarze Balken) oder Abwesenheit (weiße Balken) von 100 µM Chloroquin behandelt. Der Anteil überlebender Zellen wurde nach 72 h durch Zugabe von MTT bestimmt. Das Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA wurde in äquimolaren Konzentrationen eingesetzt und diente der Kontrolle.

Diese hier erhaltenen Daten lassen sich so interpretieren, daß die N-terminale scFv Domäne sehr wahrscheinlich die proapoptotische Aktivität des AIF verhindert. Die Translokationsdomäne des Exotoxin A war zwar notwendig für die cytotoxische Aktivität der AIF Fusionsproteine, konnte jedoch nicht als „endosome escape“ Funktion agieren, möglicherweise weil ein C-terminales KDEL-Signal fehlte. Stattdessen könnte sie die „Aktivierung“ der AIF-Domäne durch Abspaltung der N-terminalen scFv-Domäne durch die endosomale Protease Furin ermöglicht haben. Nach einer solchen Prozessierung könnte dann cytosolische Translokation durch das endosomolytische Reagenz Chloroquin bewirkt worden sein.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden Mikroinjektionsexperimente durchgeführt, bei denen die AIF Fusionsproteine unter Umgehung einer rezeptorvermittelten Aufnahme direkt in das Cytosol von Zellen injiziert wurden. Hierzu wurden humane HeLa Cervix-Adenokarzinomzellen verwendet, da in

früheren Arbeiten gezeigt war, daß die Inkubation von isolierten HeLa Zellkernen mit rekombinantem AIF_{Δ1-100} zur Chromatinkondensation führt (Susin *et al.*, 1999). Abb. 3.34 zeigt HeLa-Zellen nach cytosolischer Injektion von 5-AIF (Bild a-c), 5-E-AIF (Bild d-f) oder 5-E-AIF_{R192A/K194A} (Bild g-i). Die Injektion erfolgte zusammen mit einem EGFP Fusionsprotein, um injizierte Zellen zu identifizieren. Mit jeder Proteinkombination wurden etwa 50 Einzelzellen injiziert, für zwei Tage kultiviert und am nächsten Tag mikroskopisch analysiert. Injizierte Zellen wurden dabei anhand der grünen Fluoreszenz identifiziert und sind in den Phasenkontrastbildern mit Pfeilen markiert. In Abb. 3.34 sind jeweils repräsentative Zellen gezeigt. Als Kontrolle dienten Zellen, die mit enzymatisch aktivem rekombinantem GrB injiziert waren (Bild m-o). Die Zellkerne wurden mit Hoechst 33342 blau gefärbt. Wie in Abb. 3.34 dargestellt, zeigten HeLa-Zellen, die mit den AIF Fusionsproteinen injiziert waren, keine auffällige apoptotische Morphologie. Alle mit GrB injizierten Kontrollzellen wiesen hingegen nach zwei Tagen die kugelige Morphologie toter Zellen auf. Diese Daten stützen die Interpretation, daß AIF Fusionsproteine durch Spaltung innerhalb der Translokationsdomäne aktiviert werden müssen, um cytotoxische Aktivität zu erlangen. Auch die AIF Fusionsproteine 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/K194A}, die nach rezeptorvermittelter Aufnahme in Gegenwart von Chloroquin gegenüber A-431 Zellen eine hohe Cytotoxizität aufweisen, führten nach direkter Injektion in das Cytosol zu keiner Änderung der Morphologie.

3.4.5 Zusammenfassung der Abschnitte 3.4.1 bis 3.4.4

AIF Fusionsproteine wurden abgeleitet, denen der molekulare Bauplan von bakteriellem Exotoxin A zugrunde liegt. Das Protein 5-E-AIF besteht aus dem ErbB2 spezifischen Antikörperfragment scFv(FRP5), der Translokationsdomäne von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (Aminosäuren 252-366) und AIF (Aminosäuren 101-612). Ein Kontrollprotein war identisch aufgebaut, jedoch fehlte die bakterielle Translokationsdomäne (5-AIF). Die Fusionsproteine wurden bakteriell exprimiert und durch Ni²⁺-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aus Zellysaten gereinigt. Ein auf gleiche Weise hergestelltes Fusionsprotein (5-E-AIF_{R192A/K194A}) enthält eine AIF-Mutante, bei der die HSP70-Bindungsstelle mutiert ist („gain of function“). In verschiedenen Zellsystemen blockiert die Bindung des ATP abhängigen Chaperons HSP70 den nukleären Import von AIF und inhibiert so dessen proapoptotische Aktivität. Die gereinigten und renaturierten Proteine banden spezifisch an ErbB2 auf der Zelloberfläche und wurden innerhalb weniger Stunden in Zielzellen aufgenommen. Bindung der Fusionsproteine an DNA wurde in elektrophoretischen Mobilitätsshiftassays gezeigt, in denen AIF-Fusionsproteine elektroneutrale Komplexe mit DNA-Fragmenten bildeten. Für Wildtyp-AIF ist die Fähigkeit, DNA zu binden, entscheidend für dessen proapoptotische Aktivität. In Cytotoxizitätsassays übten 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/K194A} auf ErbB2-exprimierende A-431 Zellen einen vergleichbaren cytotoxischen Effekt aus, wie das rekombinante Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA, das im Gegensatz zu den AIF Fusionsproteinen eine Effektdomäne bakteriellen Ursprungs trägt.

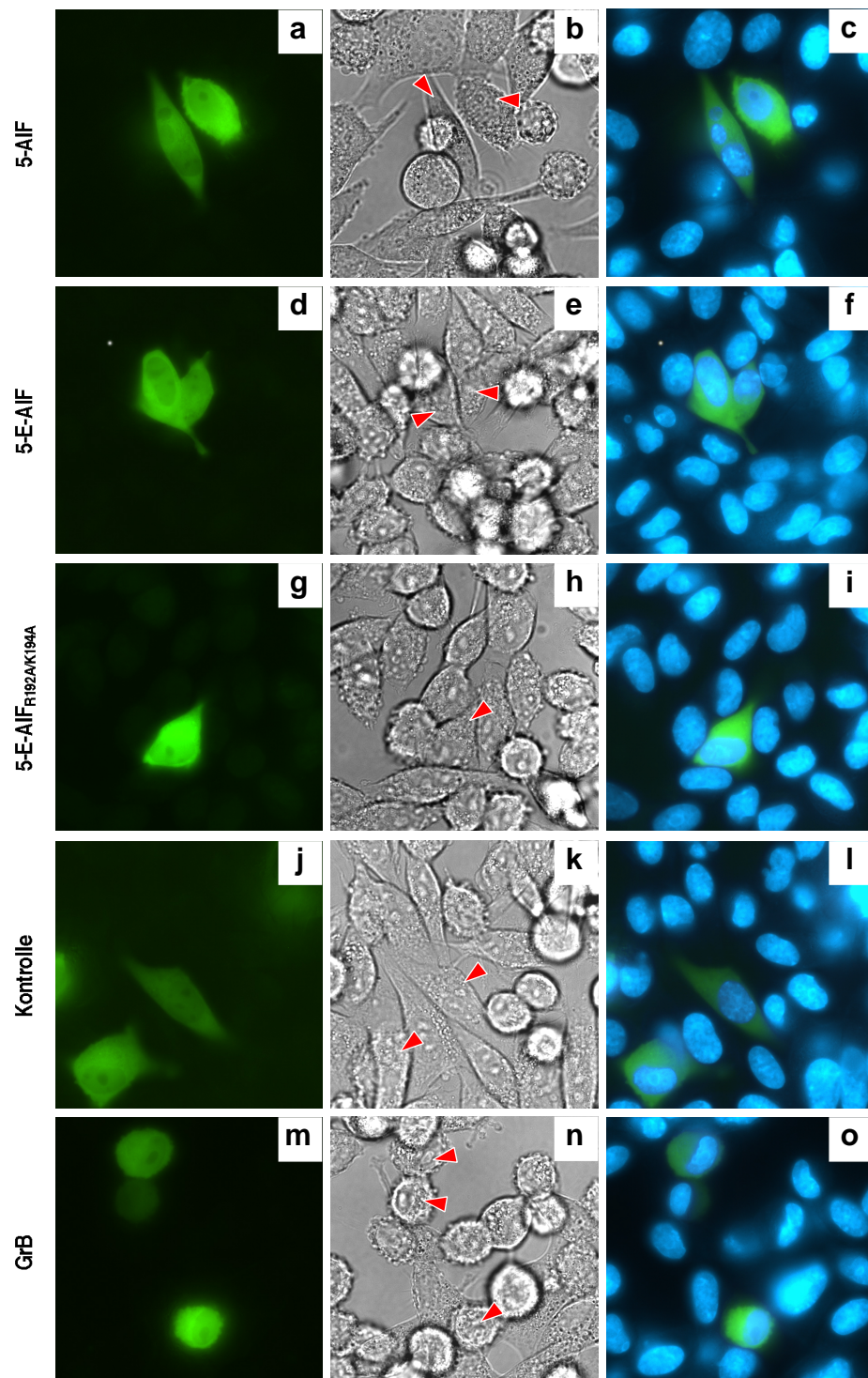


Abb. 3.34 | **Mikroinjektion von AIF Fusionsproteinen in das Cytosol von HeLa Zellen.** HeLa Zellen wurden mit 5-AIF (a-c), 5-E-AIF (d-f) oder 5-E-AIF_{R192A/K194A} (g-i) in Kombination mit GST-EGFP (grüne Fluoreszenz) oder mit GST-EGFP injiziert (j-l). Zellen, die mit GrB injiziert waren (m-o), dienten hier als Positivkontrolle für die Morphologie apoptotischer Zellen. Nach 48 h erfolgte die mikroskopische Analyse der Zellmorphologie. Dabei wurden injizierte Zellen anhand ihrer grünen Fluoreszenz identifiziert. Bilder in einer horizontalen Reihe zeigen jeweils gleiche Ausschnitte. Injizierte Zellen sind in den Phasenkontrastbildern mit Pfeilen markiert. Die Zellkerne sind mit Hoechst 33342 gefärbt.

Für die cytotoxische Aktivität der AIF Fusionsproteine war jedoch im Gegensatz zu scFv(FRP5)-ETA die

gleichzeitige Zugabe des endosomolytischen Reagenz Chloroquin erforderlich. Eine mögliche Schlußfolgerung hieraus ist, daß die Translokationsdomäne der AIF Fusionsproteine nicht funktional war. Das Kontrollprotein 5-AIF, in dem die Translokationsdomäne fehlt, zeigte auch in Kombination mit Chloroquin keinen cytotoxischen Effekt gegenüber A-431 Zellen. In Mikroinjektionsexperimenten mit HeLa-Zellen, bei denen die AIF Fusionsproteine direkt in das Cytosol injiziert wurden, übte keines dieser Proteine einen cytotoxischen Effekt aus. Diese Ergebnisse legen nahe, daß die N-terminale Antikörperdomäne der Fusionsproteine die proapoptotische Aktivität von AIF verhindert. Die Translokationsdomäne des Exotoxin A, die notwendig für die cytotoxische Aktivität der AIF Fusionsproteine ist, konnte hier nicht als „endosome escape“ Funktion wirken, sehr wahrscheinlich, weil ein C-terminales KDEL-Signal fehlt, welches für die Funktionsweise des Wildtyp-Exotoxin A notwendig ist. Stattdessen erlaubte der ETA Anteil sehr wahrscheinlich die „Aktivierung“ der AIF-Domäne durch die endosomale Protease Furin, die die Antikörperdomäne durch proteolytische Spaltung entfernt haben könnte. Die eigentliche Translokation wurde dann durch das endosomolytische Reagenz Chloroquin bewirkt.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung neuartiger, Immuntoxin-ähnlicher Fusionsproteine, die in Tumorzellen selektiv Apoptose induzieren. Hierzu wurden proapoptotische Moleküle mit tumorzell-spezifischen Zellbindungsdomänen ausgestattet, um diese Effektorproteine selektiv in Tumorzellen einzubringen.

Das hier verfolgte Konzept basiert auf der Beobachtung, daß in Tumorzellen eine Selektion auf proliferationsfördernde und Apoptose inhibierende Mutationen stattfindet. Krebstherapien wie Bestrahlung oder Chemotherapie wirken über die Induktion von Apoptose in Tumorzellen, und Resistenz gegen diese Behandlungsansätze geht einher mit der Blockierung relevanter proapoptotischer Signalwege (Debatin und Krammer, 2004; Kirkin *et al.*, 2004). Daher gibt es einen Bedarf an neuen Therapie-strategien, die vorhandene Resistenzmechanismen umgehen und alternative Angriffspunkte für eine effiziente Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen nutzen.

Um dieser Anforderung gerecht zu werden wurden rekombinante Immunttoxine entwickelt — chimäre Fusionsproteine, die aus einer tumorzellspezifischen Antikörperdomäne und einem hoch wirksamen Toxin wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A bestehen (Kreitman, 2003; Wels *et al.*, 2004). Über eine Antikörperdomäne binden Immunttoxine an tumorassoziierte Oberflächenantigene, werden über rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen und hemmen im Cytoplasma die Proteinbiosynthese, wodurch Apoptose induziert wird.

Mitglieder der ErbB-Rezeptorfamilie, insbesondere ErbB2 und der „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) werden auf einer Reihe humaner Tumoren epithelialen Ursprungs verstärkt exprimiert und eignen sich daher als Zielstrukturen für solche Immunttoxine (Yarden und Sliwkowski, 2001). Wegen des kausalen Zusammenhangs zwischen maligner Transformation und Überexpression von ErbB Rezeptoren auf Tumorzellen und ihrer guten Zugänglichkeit auf der Zelloberfläche stellen die Mitglieder der ErbB/EGF-Rezeptorfamilie geeignete Antigene für die zielgerichtete Tumorthherapie dar (Wels *et al.*, 1996).

Trotz erster Erfolge von Immuntoxinen im klinischen Einsatz steht die Immunogenität der bakteriellen Effektordomäne einer breiten Anwendung dieser Strategie im Wege (Azemar *et al.*, 2003; Kreitman *et al.*, 2000). Aus diesem Grunde wurde im Rahmen dieser Arbeit versucht, den Immuntoxinen konzeptionell ähnliche Moleküle zu entwickeln, die proapoptotische Effektorfunktionen humanen Ursprungs nutzen. Neben der zu erwartenden geringeren Immunogenität solcher Proteine könnte ein weiterer Vorteil dieser Moleküle darin bestehen, daß der apoptotische Zelltod bei der Verwendung von zentralen Apoptosesignalmolekülen schnell und effizient induziert wird.

Das Konzept, proapoptotische Moleküle durch Fusion mit tumorzellspezifischen Zellbindungsdomänen auszustatten und diese Effektorproteine zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen therapeutisch zu nutzen, ist theoretisch so naheliegend und vielversprechend wie in der praktischen Umsetzung komplex. In der Literatur sind bisher nur wenige vergleichbare Ansätze beschrieben, diese

werden in Abschnitt 4.2 in Relation zu den Daten dieser Arbeit diskutiert.

Die Tatsache, daß es bisher kaum erfolgreiche Ansätze gibt, Apoptose-Induktoren in Form von Fusionsproteinen für therapeutische Zwecke nutzbar zu machen, hat wahrscheinlich die Ursache einer schwierigen und zeitintensiven Herstellung bifunktionaler Proteine. Es müssen Proteine abgeleitet werden, in denen sich die funktionalen Domänen unabhängig voneinander korrekt falten. Eine Voraussetzung hierfür ist, daß die Proteinfaltung der einzelnen funktionellen Untereinheiten durch den Fusionspartner nicht gestört wird. Darüber hinaus ist der biologische Effekt von eingebrachten proapoptotischen Proteindomänen auf Tumorzellen nicht eindeutig vorhersehbar, da apoptotische Proteine in komplexen Signalkaskaden wirken, die noch nicht vollständig aufgeklärt sind. Das derzeitige Wissen über die molekularen Mechanismen wurde innerhalb der letzten fünfzehn Jahre gewonnen und die Dysregulation dieser Signalkaskaden stellt eine Grundvoraussetzung für die maligne Transformation von Zellen dar.

Um apoptoseinduzierende Proteine als Effektoren in potentiell therapeutisch einsetzbaren Antikörperfusionsproteinen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit zunächst das bispezifische Trägerprotein SA-5 abgeleitet.

4.1 SA-5 als tumorzellspezifisches Trägerprotein zum selektiven Einschleusen apoptoseinduzierender Proteine in Tumorzellen

SA-5 besteht aus dem ErbB2 spezifischen Antikörperfragment scFv(FRP5), das durch Genfusion mit der Sequenz des core-Streptavidin (SA) verbunden ist. Streptavidin ist ein tetrameres Protein, das von *Streptomyces avidinii* sekretiert wird und D-Biotin mit äußerst hoher Affinität bindet ($K_D=10^{-14}$ M) (Green, 1990). Core-Streptavidin ist eine verkürzte Variante von Streptavidin (Aminosäuren 13-125) mit gleicher Affinität zu Biotin.

In dieser Arbeit wurden Expressions-, Reinigungs- und Renaturierungsbedingungen etabliert, um SA-5 im mg Maßstab in *E. coli* herzustellen. Im optimierten Expressionskonstrukt hatte die Anordnung beider funktioneller Domänen mit SA am N-Terminus und der Antikörperdomäne am C-Terminus starken Einfluß auf die bei der Renaturierung erzielte Ausbeute an löslichem SA-5. Die in der Literatur beschriebenen Fusionsproteine hingegen enthalten scFv und SA Domäne in umgekehrter Orientierung. Das in dieser Arbeit abgeleitete Fusionsprotein SA-5 ist ein sehr stabiles tetrameres Protein mit Affinität zu ErbB2 auf der Oberfläche von Tumorzellen sowie zu Biotin-konjugierten Proteinen. An ErbB2 gebundenes SA-5 wurde innerhalb weniger Stunden selektiv in Zellen aufgenommen. SA-5 liegt als Tetramer vor, woraus sich im Vergleich zu monomeren scFv(FRP5) Fusionsproteinen bezüglich Zellbindung und Aufnahme mehrere denkbare Vorteile ergeben. Die höhere Avidität dieser Proteine könnte zu einer gesteigerten Affinität zu ErbB2 führen (Kipriyanov *et al.*, 1996). Der parentale mAk FRP5 führt als bivalentes Molekül zur Dimerisierung von ErbB2 und so zur Aktivierung der intrazellulären Tyrosinkinase (Harwerth *et al.*, 1992). Monomere scFv(FRP5) Fusionsproteine hingegen besitzen diese Fähigkeit nicht, eine Multivalenz könnte jedoch durch die Fusion mit einer tetrameren

Proteindomäne erzeugt werden. Eine potentielle Rezeptoraktivierung durch SA-5 könnte zu einer schnellen aktiven Aufnahme von SA-5 führen. Monovalente scFv(FRP5) Fusionsproteine hingegen werden im Zuge des physiologischen „receptor-turnover“ internalisiert, da sie den Rezeptor nicht aktivieren (Schmidt *et al.*, 1996).

Ob SA-5 als spezifisches Trägerprotein zum Einschleusen biotinylierter Proteine in ErbB2 exprimierende Tumorzellen geeignet ist, wurde zunächst mit einer biotinylierten Variante des „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) untersucht. Hierzu wurde bakteriell exprimiertes EGFP biotinyliert. Theoretisch ist die kovalente Kopplung von Biotin an alle Biomoleküle durch die Verwendung von Biotin-Sulfo-NHS-Estern möglich, das mit primären Aminen des Proteins reagiert. Im Prinzip sollte so jedes Protein durch Kopplung mit SA-5 äußerst stabile Proteinkomplexe bilden und auf diese Weise hohe Affinität zum tumorassoziierten Antigen ErbB2 erlangen.

In durchflußcytometrischen Studien konnte eine durch SA-5 vermittelte Bindung von bEGFP an ErbB2 exprimierende Zellen detektiert werden. Die Aufnahme von SA-5/bEGFP Komplexen in ErbB2 exprimierende Zellen wurde in mikroskopischen Analysen untersucht. Durch Anregung und Messung der EGFP Fluoreszenz im konfokalen Laser Scanning Mikroskop konnte die spezifische Aufnahme von SA-5/bEGFP Proteinkomplexen in das Cytoplasma ErbB2 exprimierender Zellen gezeigt werden.

Als Apoptose induzierendes Protein in SA-5/Effektorkomplexen wurde zunächst eine biotinylierte Variante des *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A (Aminosäuren 252-613, ETA42) untersucht. Das Protein wurde nach etabliertem Protokoll (Zimmermann *et al.*, 1997) in *E. coli* exprimiert, gereinigt, renaturiert und biotinyliert. ETA42 besteht aus der Translokationsdomäne sowie der katalytischen Domäne des Exotoxin A. Die natürliche Zellbindungsdomäne hingegen fehlt. Die biotinylierte Variante des ETA42 (bETA42) bildete zusammen mit dem SA-5 Trägerprotein Komplexe, die selektiv an ErbB2 exprimierende Zellen banden und mit einem fluoreszenzmarkiertem Antikörper, der bETA42 färbte, auf der Zelloberfläche detektiert werden konnten. Bei der Verwendung ErbB2-negativer Zellen bzw. der nicht-biotinylierten Variante des ETA42 wurden keine zellgebundenen Komplexe detektiert.

In Cytotoxizitätsassays wurde eine selektive cytotoxische Aktivität von SA-5/bETA42 Komplexen gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen detektiert. Bei einer SA-5-Konzentration von 5,3 nM und einer bETA42-Konzentration von 24 nM wurden etwa die Hälfte der ErbB2 exprimierenden Zellen abgetötet. ErbB2-negative Zellen hingegen waren nicht sensitiv gegenüber den Proteinkomplexen. Dies läßt darauf schließen, daß die katalytische Domäne von bETA42 ihren Wirkort erreicht hat, an dem sich ihr Substrat Elongationsfaktor 2 befindet. Im Cytosol von Zellen, in denen die katalytische Domäne von Exotoxin A enzymatisch aktiv ist, führt die kovalente Modifikation des Elongationsfaktors 2 zur Inhibition der Proteinbiosynthese und so zur Induktion von Apoptose (Thorburn *et al.*, 2004). Dies weist darauf hin, daß sowohl eine Aufnahme von bETA42 in die Zielzelle, als auch eine Translokation der katalytischen Domäne des Toxins in das Cytoplasma stattgefunden hat. Die hohe cytotoxische Aktivität des ErbB2 spezifischen Fusionsproteins scFv(FRP5)-ETA, welches einen IC₅₀ Wert von 5-6 ng/ml (ca. 0,075 nM) gegenüber Renca-lacZ/ErbB2 Zellen aufweist (Azemar *et al.*, 2003), konnte mit SA-5/bETA42 Kom-

plexen jedoch nicht erreicht werden.

Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß die tatsächliche Proteinkonzentration von bETA42 in funktionalen Komplexen nur gering war. In den Cytotoxizitätsassays wurden beide Proteinkomponenten, SA-5 und bETA42 in äquimolaren Konzentrationen bezogen auf das SA-5-Monomer eingesetzt. Eine Steigerung der bETA42-Konzentration bei konstanter SA-5-Konzentration würde theoretisch das Entstehen von Komplexen fördern, die mehrere bETA42 Moleküle enthalten und so auch eine höhere cytotoxische Aktivität besitzen müßten. Anhand der erhaltenen Daten kann keine Aussage darüber gemacht werden, wieviel bETA42 tatsächlich in Form funktioneller Komplexe vorlag. Vermutlich war der Anteil von bETA42, der durch Komplexierung mit dem SA-5 Trägerprotein tatsächlich Spezifität für Tumorzellen erhalten hatte, deutlich geringer, als die bETA42 Konzentration, die zur Generierung der Komplexe eingesetzt wurde.

Ein weiterer Erklärungsansatz, der die geringere cytotoxische Aktivität der SA-5/bETA42 Komplexe im Vergleich zum scFv(FRP5)-ETA Fusionsprotein erklären könnte, besteht darin, daß ein Teil des verwendeten bETA42 nicht vollständig funktional war, da das verwendete Biotinylierungs-Reagenz auch Lysin-Seitenketten modifiziert. Eine Lysin-Seitenkette ist jedoch auch in der „KDEL-like sequence“ (RDELK) am C-Terminus von Exotoxin A vorhanden. Dieses Signal ist essentiell für die cytotoxische Aktivität von Exotoxin A (Chaudhary *et al.*, 1990), da es als intrazelluläres „targeting“-Signal dient und in der Zielzelle einen retrograden Toxintransport über den Golgi Apparat und das endoplasmatische Retikulum ermöglicht. Modifikation dieser Sequenz durch kovalente Bindung eines Biotin-Moleküls könnte zum Funktionsverlust dieser Sequenz geführt haben.

Innerhalb dieser Arbeit wurden diese Fragestellungen bezüglich der Cytotoxizität von SA-5/bETA42 Komplexen nicht näher untersucht, da auch unter nicht optimierten Bedingungen eine signifikante und selektive cytotoxische Aktivität der Proteinkomplexe gegenüber ErbB2 exprimierenden Zellen erreicht wurde. Damit war das grundsätzliche Ziel erreicht, ein System zu etablieren, mit dem die cytotoxische Aktivität von biotinylierten proapoptotischen Effektorfunktionen gegenüber ErbB2 exprimierenden Tumorzellen untersucht werden kann.

Mit dem SA-5 Trägerprotein wurde im Rahmen dieser Arbeit auch die Serinprotease Granzym B (GrB) in ErbB2 exprimierende Tumorzellen eingeschleust, um selektiv in diesen Zellen Apoptose zu induzieren. GrB wurde als Effektor ausgewählt, da diese Protease Apoptose an mehreren zentralen Stellen apoptotischer Signalkaskaden induziert. Das Protein spaltet im Cytosol von Zielzellen Caspasen und Caspasen-Substrate und wirkt daher wie eine aktive Effektorcaspase. Obwohl die Präferenz, mit der GrB Substrate spaltet, derzeit kontrovers diskutiert wird (Adrain *et al.*, 2004; Waterhouse *et al.*, 2005), erscheint es gesichert, daß GrB auch beim funktionellen Verlust proapoptotischer Signalmoleküle – eine Situation, die häufig in Tumorzellen auftritt – weiterhin Apoptose induzieren kann (Barry und Bleackley, 2002; Russell und Ley, 2002). Da GrB Effektorcaspasen aktiviert, dürften viele Resistenzmechanismen, wie z. B. die funktionelle Inaktivierung des P53 Signalwegs oder die Herunterregulation von Caspase-8, keine Resistenz gegenüber GrB induzierter Apoptose verleihen.

Die Herstellung von enzymatisch aktivem reifem GrB war in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert (Giesübel, 2003). Rekombinantes GrB, das von Dr. Ulrike Giesübel zur Verfügung gestellt wurde, war heterolog in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert, per Ni^{2+} -Affinitätschromatographie gereinigt und biotinyliert. Die effiziente Kopplung von Biotin an GrB wurde im Immunoblot überprüft. Durch die Analyse der Spaltung einer rekombinanten Form von Procaspase-3 als Substrat für GrB wurde gezeigt, daß die biotinylierte GrB Variante Procaspase-3 mit vergleichbarer Aktivität wie das nicht-biotinylierte Protein prozessiert. Daraus ergab sich, daß die enzymatische Aktivität der Protease durch die Biotinylierung nicht beeinflusst wurde. In einem Bindungstest mit SA-beschichteten Mikrotiterplatten wurde gezeigt, daß an SA gebundenes bGrB ein colorimetrisches Peptidsubstrat mit GrB-Erkennungssequenz spaltet. Die Bindung von bGrB an SA blockierte also nicht die katalytische Aktivität der Serinprotease.

Biotinyliertes GrB, welches mit Hilfe des SA-5 Fusionsproteins in ErbB2 exprimierende Zellen eingebracht wurde, tötete diese Zellen. Dies wurde in MTT-Cytotoxizitätsassays gezeigt, in denen ErbB2-positive und ErbB2-negative Zellen mit SA-5/bGrB Komplexen in Gegenwart von Chloroquin inkubiert wurden. Die cytotoxische Aktivität der Komplexe hing dabei von der Präsenz des Zielrezeptors ErbB2 auf der Zelloberfläche sowie von der Gegenwart des endosomolytischen Reagenz Chloroquin ab. Im Gegensatz zu Exotoxin A besitzt GrB keine Translokationsdomäne, die den „endosome escape“ der katalytischen Domäne vom endosomalen Kompartiment in das Cytosol bewirkt. GrB benötigt aber Zugang zu zellulären Substraten im Cytosol und im Zellkern, um Apoptose zu induzieren. Unter physiologischen Bedingungen bewirkt Perforin, das zusammen mit GrB aus cytotoxischen Lymphocyten sekretiert wird, diese cytosolische Translokation von GrB. Mit den in dieser Arbeit konstruierten GrB-Fusionsproteinen wurde der Einfluß von Chloroquin auf die intrazelluläre Lokalisation von GrB näher untersucht (vgl. Abschnitt 4.2 dieser Diskussion). In den durchgeführten MTT-Cytotoxizitätsassays wurden ErbB2 positive Renca-lacZ/ErbB2 und ErbB2 negative Renca-lacZ Zellen bzw. ErbB2-positive MDA-MB 453 und ErbB2-negative MDA-MB 468 Zellen zusammen mit SA-5/bGrB Komplexen in Gegenwart von Chloroquin inkubiert. Die Überlebensrate der Zellen wurde nach 14 h durch Zugabe von MTT bestimmt. Bei einer GrB Konzentration von 25 nM starben etwa 80 % der ErbB2 exprimierenden Renca-lacZ/ErbB2 Zellen. Im Gegensatz hierzu zeigten ErbB2 negative parentale Renca-lacZ nur geringe Sensitivität gegenüber den Proteinkomplexen. Diese spezifische cytotoxische Aktivität der SA-5/bGrB Proteinkomplexe in Gegenwart von Chloroquin konnte auch gegenüber ErbB2 exprimierenden MDA-MB 453 Mammakarzinomzellen beobachtet werden, wohingegen MDA-MB 468 als ErbB2 negative Mammakarzinomzellen keine Sensitivität gegenüber diesen Proteinkomplexen zeigten. Zellen, die jeweils einzeln mit SA-5 oder bGrB inkubiert wurden, zeigten auch in Gegenwart von Chloroquin keine oder nur geringe Sensitivität.

Die erhobenen Daten zeigen, daß mit einem Antikörper-basierten Ansatz das Einschleusen ausreichender Mengen von GrB in Tumorzellen möglich ist, um diese selektiv zu eliminieren. SA-5/bGrB Komplexe wiesen in Gegenwart von Chloroquin bei gleichen molaren Konzentrationen eine stärkere

cytotoxische Aktivität auf als SA-5/bETA42 Komplexe. Die Daten der in dieser Arbeit durchgeführten Cytotoxizitätsassays, bei denen bETA42 oder bGrB als Effektoren verwendet wurden, sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da nicht sichergestellt werden konnte, daß SA-5/Effektor Komplexe tatsächlich gleiche Effetorkonzentrationen enthielten. Generell kann durch die hier verwendete Methode der Protein-Biotinylierung nicht vorhergesagt werden, wie viele Biotin-Moleküle die Effektoren auf der Oberfläche tragen, was eine Vorhersage des Verhältnisses beider Komplexkomponenten nicht zuläßt. Eine alternative Biotinylierungsmethode stellt die Verwendung von *in vivo* Biotinylierungssequenzen dar. Dies sind Signalsequenzen, die durch Genfusion mit dem Effektor fusioniert werden und im herstellenden Organismus posttranslational mit Biotin gekoppelt werden. Die Fusion mit einer solchen Biotinylierungssequenz würde die Bindung nur eines Biotin-Moleküls pro Effektormolekül bewirken. Mit solchen in Bezug auf die SA-Bindung „monovalenten“ Effektormolekülen wäre dann die Bildung definierter SA-5/Effektorkomplexe möglich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf einen solchen Ansatz nicht weiter eingegangen, da besonders die Ableitung von GrB Fusionsproteinen, in denen enzymatisch aktives GrB durch Genfusion direkt mit tumorzellspezifischen Zellbindungsdomänen verbunden ist, vielversprechend erschien.

4.2 GrB als apoptoseinduzierender Effektor in tumorzellspezifischen Fusionsproteinen

Als tumorzellspezifische Zellbindungsdomänen wurde neben dem ErbB2 spezifischen Antikörperfragment scFv(FRP5) auch der Ligand des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) TGF α eingesetzt, um ein Fusionsprotein mit Spezifität für EGFR exprimierende Tumorzellen abzuleiten. Die Zellbindungsdomänen sind in den Fusionsproteinen GrB-5 und GrB-T an den C-Terminus von GrB fusioniert. Beide Proteine wurden in der Hefe *Pichia pastoris* exprimiert und konnten in hohen Ausbeuten aus Hefekulturüberständen gereinigt werden. Um die unabhängige Faltung von Zellbindungs- und katalytischer Domäne innerhalb der Fusionsproteine sicherzustellen, wurde zwischen beide Proteindomänen ein flexibler Linker (Gly₄-Ser)₄ eingefügt. Dieser Linker bewirkte bei der Expression von GrB-5 eine Steigerung der Ausbeute und der Proteinstabilität. Ein Protein, in dem der Linker nicht vorhanden war, wurde in *Pichia pastoris* nur schlecht exprimiert und lag proteolytisch degradiert vor (Daten nicht gezeigt). Der Versuch, GrB Fusionsproteine in *E. coli* zu exprimieren, war im Rahmen dieser Arbeit (Daten nicht gezeigt) wie auch in einer vorangegangenen Arbeit nicht erfolgreich (Giesübel, 2003). Die Proteine konnten zwar in hohen Ausbeuten in *E. coli* exprimiert werden, waren jedoch zum überwiegenden Teil unlöslich und Renaturierungsversuche führten nicht zur Generierung von enzymatisch aktivem GrB (Daten nicht gezeigt).

Aus Hefekulturüberständen gereinigte GrB Fusionsproteine wiesen vergleichbare enzymatische Aktivität auf, wie unfusioniertes rekombinantes GrB aus *Pichia pastoris*. In durchflußcytometrischen Studien banden beide Fusionsproteine spezifisch an ErbB2 bzw. EGFR auf der Zelloberfläche von Tumorzellen. Die Spezifitäten wurden zusätzlich in Konkurrenzexperimenten bestätigt.

Für Wildtyp-GrB ist bekannt, daß es an bisher nicht identifizierte Zielstrukturen auf Zellober-

flächen bindet und schon nach wenigen Minuten in Zellen aufgenommen wird. Auch rekombinantes GrB aus der Hefe *Pichia pastoris* verhält sich bezüglich dieser „intrinsischen“ Zellbindung wie endogen exprimiertes GrB aus cytotoxischen T-Lymphocyten (Giesübel, 2003). Für den Einsatz von GrB als Apoptoseinduktor in Antikörperfusionsproteinen könnte diese intrinsische Zellbindung bei der Verwendung *in vivo* ein Problem darstellen. Internalisierung der Fusionsproteine über die intrinsische Bindung des GrB Anteils in normalen Geweben könnte dazu führen, daß die Fusionsproteine am Wirkort nicht mehr zur Verfügung stehen. Die in dieser Arbeit exprimierten GrB Fusionsproteine zeigten in durchflußcytometrischen Studien allerdings nur sehr schwache Bindung an Zellen, die den Zielrezeptor der Proteine nicht exprimierten. Diese Bindung wurde wahrscheinlich durch die intrinsische Bindung der GrB Domäne hervorgerufen. Die Bindung an ErbB2 bzw. EGFR hingegen, die über die Zellbindungsdomänen der Fusionsproteine erfolgt, führte zu deutlich stärkeren Signalen.

Obwohl beide Proteindomänen der GrB Fusionsproteine hinsichtlich Zellbindung und enzymatischer Aktivität funktional waren, konnte in MTT-Assays zunächst keine cytotoxische Aktivität von GrB-5 und GrB-T gegenüber Tumorzellen beobachtet werden, die den jeweiligen Zielrezeptor exprimieren. Da die proapoptotische Aktivität von GrB durch Spaltung cytosolischer und nukleärer Substrate vermittelt wird (Andrade *et al.*, 2004; Sarin *et al.*, 1997; Talanian *et al.*, 1997; Waterhouse *et al.*, 2005), lag die Vermutung nahe, daß ein „endosome escape“ Mechanismus notwendig ist, durch den die GrB Fusionsproteine in das Cytosol gelangen. Immunfluoreszenzmikroskopische Analysen, in denen die intrazelluläre Lokalisation der GrB Fusionsproteine untersucht wurde, zeigten in der Tat eine Lokalisation der Proteine in membranumschlossenen Vesikeln. Die grundsätzliche Fähigkeit der Fusionsproteine, Apoptose in Tumorzellen zu induzieren, sofern Zugang zu cytosolischen Substraten besteht, wurde in Mikroinjektionsexperimenten gezeigt. Injektion von GrB-5 in das Cytosol von Renca-lacZ Zellen initiierte ausgeprägte apoptotische Morphologie. Um intrazelluläre GrB Fusionsproteine nach rezeptorvermittelter Aufnahme aus diesen Vesikeln freizusetzen, wurde das endosomolytische Reagenz Chloroquin eingesetzt. In Gegenwart von Chloroquin wiesen die Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T einen selektiven cytotoxischen Effekt gegenüber etablierten Tumorzelllinien auf, die den jeweiligen Zielrezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren. Die IC_{50} Werte der Proteine gegenüber Zielzellen wurden nach 14 h in Gegenwart von Chloroquin in MTT-Assays bestimmt und lagen abhängig von der eingesetzten Zelllinie im piko- bis nanomolaren Bereich. Diese cytotoxischen Aktivitäten sind vergleichbar mit denen der ErbB2 und EGFR spezifischen rekombinanten Immun- bzw. Wachstumsfaktortoxine scFv(FRP5)-ETA (Maurer-Gebhard *et al.*, 1998; Wels *et al.*, 1992) und TGF α -ETA (Schmidt und Wels, 1996), die eine Effektdomäne bakteriellen Ursprungs tragen.

Zellen, die den jeweiligen Zielrezeptor nicht exprimierten, waren auch bei hohen Proteinkonzentrationen nicht sensitiv gegenüber den GrB Fusionsproteinen.

Bereits 3 h nach Proteinzugabe induzierte GrB-5 eine ausgeprägte apoptotische Morphologie in ErbB2 exprimierenden Zellen. Diese Daten zeigten erstmals, daß GrB in Form von Antikörperfusionsproteinen Apoptose selektiv und effizient und mit Kinetiken vergleichbar dem GrB/Perforin System

induziert. Unfusioniertes GrB oder inaktive Mutanten der Fusionsproteine, bei denen das Serin im katalytischen Zentrum gegen Alanin ausgetauscht war, wiesen keine cytotoxische Aktivität auf. Die cytotoxische Aktivität der GrB Fusionsproteine hängt damit von der Präsenz der Zellbindungsdomäne und von der enzymatischen Aktivität der GrB Domäne ab.

Die Tatsache, daß nicht fusioniertes GrB auch in relativ hohen Proteinkonzentrationen keine cytotoxische Aktivität aufwies, zeigt, daß die Protease nach der Aufnahme auch in Gegenwart von Chloroquin keinen Zugang zum Cytosol erlangt. Die Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T hingegen werden durch Chloroquin effizient aus dem endosomalen Kompartiment freigesetzt. Nicht fusioniertes GrB, welches nach „intrinsischer“ Zellbindung internalisiert, muß daher in einer Art von Vesikeln vorhanden sein, aus denen die Protease nicht durch Chloroquin freigesetzt werden kann. Ein weiterer Hinweis hierfür ist, daß GrB Fusionsproteine in Zielzellen in Gegenwart von Chloroquin endogene Procaspase-3 in einem direkten Mechanismus aktivieren. In Abwesenheit von Chloroquin erfolgt keine Aktivierung, da keine Translokation stattgefunden hat. Zellen hingegen, die mit äquimolaren Mengen an GrB behandelt wurden, zeigten auch in Gegenwart von Chloroquin keine Spaltung von Procaspase-3.

In dieser Arbeit wurde auch versucht, die Funktion von Chloroquin durch Einfügen einer zusätzlichen Proteindomäne in das Fusionsprotein GrB-5 zu ersetzen. Dazu wurde die Translokationsdomäne des Diphtherietoxins („diphtheria toxin translocation domain“, DTT) zwischen katalytischer und Zellbindungsdomäne eingefügt, um so dem Protein selbst die Fähigkeit zu verleihen, in das Cytosol zu translozieren. Das resultierende Fusionsprotein GrB-DTT-5 war jedoch nach der Expression in Hefe stark degradiert und konnte nicht als vollständiges Protein in präparativen Mengen aus Hefekulturüberständen gereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Der Einsatz von Chloroquin *in vivo* stellt allerdings nicht notwendigerweise ein Problem dar, da Chloroquin bereits in hohen Dosen als endosomolytisches Reagenz in therapeutischen Tiermodellen ohne signifikante Nebenwirkungen eingesetzt wird (Zhang *et al.*, 2003). Beim Menschen dient Chloroquin der Therapie von Malaria und wird als Basistherapeutikum bei der Behandlung rheumatischer Erkrankungen verwendet (Mutschler *et al.*, 2001).

Zeitgleich zu den hier durchgeführten Arbeiten zum selektiven Einschleusen von GrB in Tumorzellen wurden andere Arbeiten veröffentlicht, in denen das gleiche Ziel verfolgt wurde (Liu *et al.*, 2003a; Liu *et al.*, 2003b). In diesen Arbeiten wurden GrB Fusionsproteine bestehend aus GrB und dem „vascular endothelial growth factor“ (VEGF) bzw. dem gp240 spezifischen scFvMEL als tumorzell-spezifische Bindungsdomänen konstruiert. Beide Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und in nativer Form gereinigt. Die Proteine wurden allerdings in enzymatisch inaktiver Form erhalten und mußten zunächst durch Zugabe von Protease aktiviert werden. Zur Induktion von Apoptose durch GrB-VEGF und GrB-scFvMEL war eine 10 bis 100 fach höhere Proteinkonzentration im Vergleich zu den hier beschriebenen GrB Fusionsproteinen erforderlich. Außerdem erforderte die Induktion von Apoptose durch diese Proteine eine deutlich längere Zeit (16 bis 24 h für positive TUNEL-Färbungen und 72 h für die Messung der cytotoxischen Aktivität). Eine mögliche Erklärung für diese erheblichen Unterschiede

bezüglich Kinetik und cytotoxischer Aktivität liegt wahrscheinlich in unterschiedlichen enzymatischen Aktivitäten der GrB Fusionsproteine begründet. Unklar bleibt auch, wie die Fusionsproteine GrB-VEGF und GrB-scFvMEL nach Rezeptorvermittelter Aufnahme das Cytosol der Zielzelle erreichen. Offensichtlich erfolgte bei diesen Proteinen eine Translokation der GrB Fusionsproteine aus dem endosomalen Kompartiment, ohne daß hierfür ein endosomolytisches Reagenz zugegeben werden mußte. Diese Daten stehen im Gegensatz zu den hier mit den GrB-5 und GrB-T erarbeiteten Daten, bei denen auch bei hohen Proteinkonzentrationen Chloroquin für die Translokation und für die cytotoxische Aktivität der Fusionsproteine benötigt wurde.

In einem vergleichbaren Ansatz wurde ein Disulfidbrücken-verknüpftes GrB Immunkonjugat aus dem Disulfidbrücken-stabilisierten Fv-Fragment (dsFv) des mAk B3, der das tumorassoziierte Lewis Y Antigen erkennt, hergestellt (Kurschus *et al.*, 2004). In dieser Arbeit wurde GrB als Proenzym in *E. coli* exprimiert, denaturiert, gereinigt, renaturiert, durch Cathepsin C aktiviert und an das Antikörperfragment gekoppelt. Die mit diesem Immunkonjugat erzielten cytotoxischen Aktivitäten waren im Vergleich zu den ErbB2 und EGFR spezifischen GrB-Fusionsproteinen GrB-5 und GrB-T ebenfalls gering, und die IC₅₀ Werte des Immunkonjugats waren nach 48 h um den Faktor 10 bis 300 höher als die in dieser Arbeit nach 14 h gemessenen IC₅₀ Werte. Für die cytotoxische Aktivität des GrB Immunkonjugats war ebenfalls im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Daten keine „endosome escape“ Funktion erforderlich.

Neben diesen GrB Fusionsproteinen sind in der Literatur zwei weitere Ansätze beschrieben, bei denen Caspase-3 bzw. GrB in Form von Fusionsproteinen zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen verwendet wurden. Als tumorspezifische Bindungsdomäne diente hier jeweils der ErbB2 spezifische scFv e23sFv (Jia *et al.*, 2003; Zhao *et al.*, 2004). Neben katalytischer und Zellbindungsdomäne enthielten diese Proteine auch die Translokationsdomäne des bakteriellen Exotoxin A, die den Fusionsproteinen einen Übertritt der katalytischen Domäne vom endosomalen Kompartiment in das Cytosol erlaubten. Die Fusionsproteine wurden jedoch nicht als gereinigte rekombinante Proteine eingesetzt. Humane Jurkat Lymphomzellen wurden mit den Expressionskonstrukten transfiziert und zusammen mit ErbB2 exprimierenden Zielzellen kultiviert. Die Sekretion der Fusionsproteine führte zum selektiven Abtöten ErbB2 exprimierender Zellen *in vitro* und zu einem verminderten Tumorstadium *in vivo*. Ein Vergleich der Daten mit denen dieser Arbeit ist nicht möglich, da die Proteinkonzentrationen der sekretierten ErbB2 spezifischen Fusionsproteine in den Überständen der Jurkat Zellen nicht untersucht wurden. Die Tatsache, daß transfizierte Zellen an Stelle von gereinigten rekombinanten Proteinen eingesetzt wurden, unterstreicht allerdings die technischen Schwierigkeiten, die die Generierung von Antikörperfusionsproteinen bereitet.

Neben den bisher beschriebenen Ansätzen, GrB in Form von Fusionsproteinen zur selektiven Induktion von Apoptose in Tumorzellen zu verwenden, wurde auch der Einsatz von vier weiteren Effektordomänen in Tumorzell-spezifischen Fusionsproteinen beschrieben. Die proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bik, Bak und Bax sowie die Nuklease CAD wurden mit dem Peptidhormon „gonadotropin releasing hormone“ (GnRH) als tumorspezifische Zellbindungsdomäne fusioniert (Ben-Yehudah und

Lorberboum-Galski, 2004). Der GnRH Rezeptor wird auf verschiedenen Adenokarzinomen überexprimiert. Die Proteine wurden in *E. coli* exprimiert und ohne vorherige Proteinreinigung in Zellysaten zur weiteren Analyse eingesetzt. *In vitro* zeigten die Bik-, Bak- und Bax-Fusionsproteine cytotoxische Aktivität gegenüber GnRH überexprimierenden Tumorzellen, allerdings nur in Gegenwart sehr hoher Proteinkonzentrationen (5-10 µg/ml) und nach langen Inkubationszeiten (72 h) (Azar und Lorberboum-Galski, 2000). Gleiches gilt für das Fusionsprotein, in dem CAD als Effektorfunktion verwendet wurde. Auch hier führten hohe Proteinkonzentrationen (5 µg/ml) nach langen Inkubationszeiten (72 h) nur partiell zum Absterben (40 % überlebende Zellen) der Zellen (Ben-Yehudah *et al.*, 2003).

Eine mögliche Erklärung für die in diesen Veröffentlichungen beobachteten niedrigen cytotoxischen Aktivitäten der Fusionsproteine ergibt sich aus der Rolle, die diese apoptotischen Signalmoleküle bei der Apoptoseinduktion spielen. Obwohl die proapoptotischen Bcl-2 Proteine Bik, Bak und Bax in apoptotischen Signalkaskaden wirken, sind diese Proteine, genau wie CAD, keine direkten Induktoren des apoptotischen Zelltods. Proteine der Bcl-2 Proteinsuperfamilie sind Teil eines komplexen regulatorischen Netzwerks, und DNA-Schäden, die durch CAD induziert werden, reichen alleine wahrscheinlich nicht aus, um Apoptose effizient zu induzieren.

In einer weiteren Arbeit wurde Caspase-3 als Effektorfunktion in einem therapeutischen Ansatz zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen eingesetzt (Vocero-Akbani *et al.*, 1999). Die Spezifität für infizierte Zellen wurde dadurch erreicht, daß eine modifizierte Form der Procaspase-3 verwendet wurde, in der die endogene Spaltstelle zwischen großer und kleiner Caspase-Untereinheit durch eine Erkennungssequenz der HIV-Protease ausgetauscht wurde. Infizierte Zellen, in denen die HIV-Protease vorlag, wurden so durch Aktivierung der Caspase-3 und die resultierende Induktion von Apoptose eliminiert. Nicht-infizierte Zellen hingegen waren aufgrund der fehlenden proteolytischen Aktivität resistent. Um das rekombinante Protein in Zellen einzuschleusen, wurde das Caspase-3 Derivat mit der kationischen „protein transduction sequence“ des HIV Tat Proteins (Nagahara *et al.*, 1998) fusioniert, das eine unselektive Aufnahme in Zellen erlaubt. Zur Eliminierung HIV-infizierter Zellen *in vitro* waren bei diesem Ansatz allerdings sehr hohe Proteinkonzentrationen im dreistelligen nanomolaren Bereich erforderlich. Während frühere Arbeiten die „protein transduction sequence“ des Tat Proteins als sehr effizient hinsichtlich des Einschleusens angehängter Polypeptide beschreiben, zeigen neuere Publikationen, daß die basischen Aminosäuren zu einer unspezifischen Bindung von Proteinen an Zellen führen, nicht aber den aktiven Membrandurchtritt fördern (Leifert *et al.*, 2002). Für die therapeutische Applikation von Proteinen in Zellen erscheint ein derartiger unspezifischer Aufnahmemechanismus daher als wenig effizient und liefert eine mögliche Erklärung für die Notwendigkeit der hohen Proteinkonzentrationen des Caspase-3 Fusionsproteins.

Ein wichtiges Kriterium eines Effektors in apoptoseinduzierenden Antikörperfusionsproteinen ist die Auswahl eines Proteins, das trotz vorhandener Resistenzmechanismen in Tumorzellen Apoptose induziert. Das einzige humane Protein, das GrB inhibiert, ist der zur Familie der Serpine gehörende Proteinase Inhibitor-9 (PI-9) (Trapani, 2001). Normalerweise wird PI-9 in lymphoiden Geweben,

immunprivilegierten Geweben und T-Lymphocyten, sowie in reifen dendritischen Zellen und Endothelzellen exprimiert (Buzza *et al.*, 2001; Medema *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 1996). In hohen Konzentrationen ist PI-9 in cytotoxischen T-Zellen und NK-Zellen vorhanden, und dient dort als Eigenschutzmechanismus gegen sekretiertes oder intrazellulär fehlgeleitetes GrB. Darüber hinaus konnte die Expression von PI-9 in diversen humanen Tumoren beobachtet werden, woraus in einigen Fällen eine partielle Resistenz dieser Tumorzellen gegenüber CTL vermittelter Apoptose *in vitro* und *in vivo* resultierte (Classen *et al.*, 2004; Medema *et al.*, 2001). Die in dieser Arbeit verwendeten humanen A-431 Vulvakarzinomzellen exprimieren PI-9 mRNA (Giesübel, unveröffentlicht) und damit wahrscheinlich auch PI-9 Protein. A-431 Zellen wurden jedoch durch beide GrB Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T abgetötet, zeigten allerdings eine geringere Sensitivität als die PI-9 negativen Zelllinien Renca-lacZ/ErbB2 gegenüber GrB-5 und MDA-MB 468 gegenüber GrB-T. Möglicherweise ist dabei ein relativer Überschuß an GrB Fusionsproteinen entscheidend für die noch nachweisbare Cytotoxizität.

Die Morphologie von A-431 Zellen, die mit GrB-5 oder GrB-T zusammen mit Chloroquin behandelt waren, legt nahe, daß die Zellen durch Induktion von Apoptose gestorben sind. Neben dem charakteristischen „membrane blebbing“ konnte die typische Kondensation der nukleären DNA durch Färbung mit dem DNA-Farbstoff Hoechst-33342 gezeigt werden.

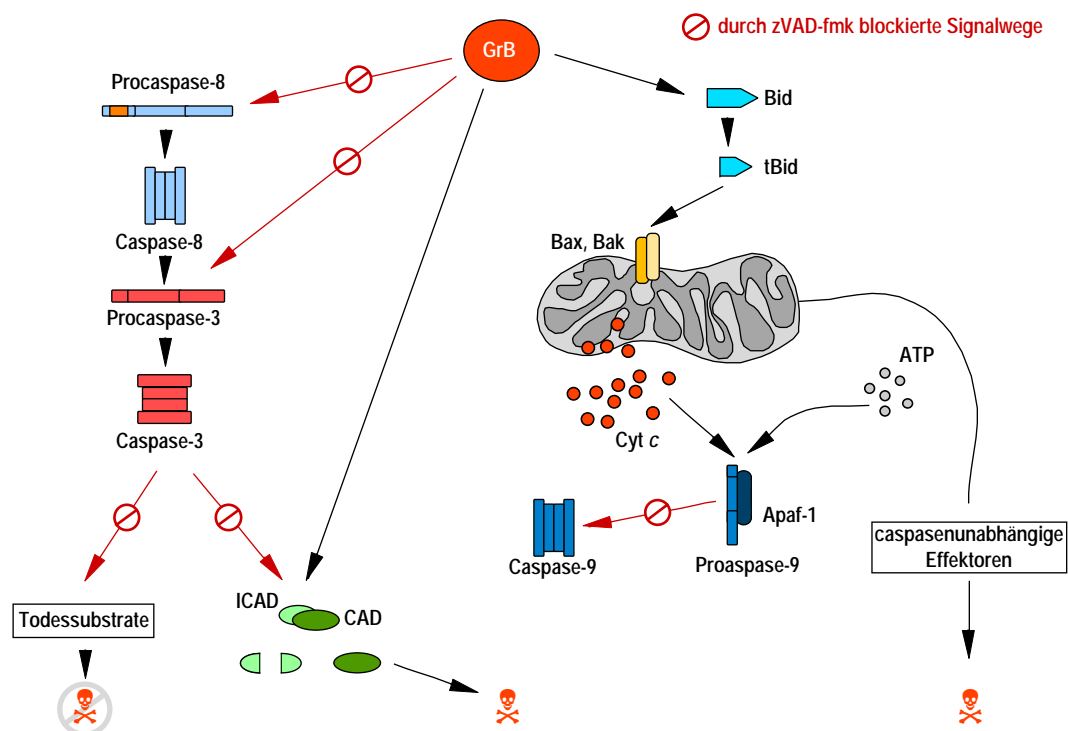


Abb. 3.1 | **Caspasenunabhängige Mechanismen der durch GrB induzierten Apoptose.** Bei Blockade von Caspasen durch den Caspaseninhibitor zVAD-fmk induziert GrB dennoch Apoptose. Durch GrB induzierte, caspasenunabhängige Signalwege sind die Spaltung von Bid und die durch tBid vermittelte Freisetzung caspasenunabhängig wirkender Effektoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Ein weiterer Mechanismus besteht in der Spaltung von ICAD, dem Inhibitor der „caspase activated DNase“ CAD. Spaltung von ICAD führt zur Translokation von CAD in den Zellkern und zur internukleosomalen Fragmentierung der chromosomalen DNA.

Als weiteres Charakteristikum apoptotischer Zellen wurde die Aktivierung von Effektorcaspase-3 und Initiatorcaspasen-8 und -9 in A-431 Zellen analysiert, die mit GrB-5 bzw. GrB-T behandelt waren. Die Aktivierung dieser Caspasen durch die GrB Fusionsproteine bestätigt, daß GrB-5 und GrB-T Apoptose durch Aktivierung zentraler Apoptosesignalmoleküle induzieren. Caspase-3 wird durch die Fusionsproteine durch einen direkten Mechanismus aktiviert. Gleichzeitige Behandlung von A-431 Zellen mit GrB Fusionsproteinen und dem Caspaseinhibitor zVAD-fmk blockierte zwar die enzymatische Aktivität von Caspase-3 -8 und -9, die Spaltung von Caspase-3 zwischen großer und kleiner Untereinheit konnte jedoch nicht verhindert werden und kann daher nur durch exogenes GrB verursacht worden sein.

Wie erwartet war die Aktivierung endogener Caspasen durch GrB Fusionsproteine jedoch nicht allein für die Induktion von Apoptose verantwortlich. Blockierung der enzymatischen Aktivität der Caspasen durch den Caspase-Inhibitor zVAD-fmk führte zwar zu einer reduzierten cytotoxischen Aktivität von GrB-5 gegenüber A-431 Zellen, konnte diese aber nicht vollständig inhibieren. Dies läßt sich dadurch erklären, daß GrB neben einigen Caspasen auch die Caspasen-Substrate Bid und ICAD aktiviert (vgl. Abb. 3.1). Spaltung von Bid führt auch zur Freisetzung caspasenunabhängiger Effektoren aus den Mitochondrien, und Spaltung von ICAD hat die nukleäre Translokation von CAD und die internukleosomale Spaltung der chromosomalen DNA zur Folge.

Um die weitere Charakterisierung von GrB-5 und GrB-T zu erleichtern, wurde in dieser Arbeit ein Schwerpunkt auch auf die Optimierung der Expression dieser Fusionsproteine in Hefe gelegt. Dadurch sollte die Voraussetzung für die Herstellung großer Mengen an GrB Fusionsproteinen für einen späteren Einsatz in *in vivo* Experimenten geschaffen werden. Während dies im Rahmen dieser Arbeit noch nicht umfassend umgesetzt werden konnte, wurden jedoch vielversprechende Daten gewonnen, die den grundsätzlichen Nutzen des hier bearbeiteten Ansatzes belegen.

4.3 Optimierte Expression rekombinanter Proteine in der Hefe *Pichia pastoris*

Ein Hauptproblem bei der Produktion multifunktionaler Proteine für eine experimentell-therapeutische Nutzung ist mit der technischen Schwierigkeit verbunden, aktive Proteine in ausreichenden Mengen zu generieren. Die in dieser Arbeit charakterisierten GrB Fusionsproteine GrB-5 und GrB-T wurden im eukaryotischen Hefeexpressionssystem *Pichia pastoris* in funktional aktiver Konformation exprimiert. Bei Expression von GrB Fusionsproteinen in *E. coli* hingegen lagen diese hauptsächlich in Form unlöslicher „inclusion bodies“ vor, und die Renaturierung der denaturierten und gereinigten Proteine in ihre aktive Konformation war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt) (Giesübel, 2003). „Inclusion bodies“ werden durch falsche Proteinfaltung hervorgerufen, wodurch hydrophobe Bereiche des Proteins exponiert sind und so zur Interaktion mit hydrophoben Bereichen anderer Polypeptidketten zur Verfügung stehen (Goloubinoff *et al.*, 1999; Jaenicke, 1998). Ein Ansatz, die Löslichkeit heterolog exprimierter Proteine zu erhöhen, besteht darin, sie in Form von Fusionsproteinen mit einer löslichen Proteindomäne („solubilizing agent“) zu exprimieren (Nygren *et al.*, 1994; Uhlen *et al.*, 1992). Hierzu eingesetzte Fusionspartner sind u. a. die Glutathion-S-Transferase (GST) (Tudyka und Skerra, 1997) und das Maltose

Bindungsprotein (MBP) (di Guan *et al.*, 1988; Kapust und Waugh, 1999). Für viele Proteine konnte gezeigt werden, daß ihre Löslichkeit und Stabilität durch Fusion mit MBP erhöht wird (Hayhurst, 2000; Jacquet *et al.*, 1999; Pryor und Leiting, 1997; Yoda *et al.*, 2000), was dadurch erklärt werden kann, daß MBP die korrekte Faltung des Fusionspartners fördert. Aus diesem Grunde wird MBP im Kontext von Fusionsproteinen auch als Chaperon bezeichnet (Bach *et al.*, 2001; Kapust und Waugh, 1999). Diese stabilisierenden und die Löslichkeit verbessernden Eigenschaften des MBP führen häufig auch zu einer generellen und mitunter starken Ausbeutesteigerung an löslichem Fusionsprotein bei der bakteriellen Expression im Vergleich zum unfusioniert exprimierten Protein. Im Gegensatz zu prokaryotischen Expressionssystemen liegt der Vorteil eukaryotischer Systeme in der oft vielfältigeren Fähigkeit zur Prozessierung, Faltung und posttranslationalen Modifizierung (z. B. Glykosylierung) heterolog exprimierter Proteine. Im Gegensatz zu höheren Eukaryoten, in denen oft nur geringe Mengen rekombinanter Proteine hergestellt werden können, eignen sich Hefen zur Generierung vergleichsweise großer Proteinmengen [Übersicht: (Cereghino und Cregg, 2000; Cregg *et al.*, 2000)] — die in *E. coli* möglichen Ausbeuten können allerdings häufig nicht erreicht werden. In dieser Arbeit wurde versucht, die oben beschriebenen positiven Eigenschaften der „solubilizing agents“ bezüglich Löslichkeit, Stabilität und Ausbeute bei der bakteriellen Proteinexpression in *E. coli* auch auf das *Pichia pastoris* Expressionssystem zu übertragen. Um das „solubilizing agent“ posttranslational *in vivo* vom Fusionspartner zu trennen, wurde in den hier verwendeten Expressionskonstrukten zwischen „solubilizing agent“ und Fusionspartner eine Erkennungssequenz der Protease Furin eingefügt. Das Hefehomolog von Furin ist Kexin. Kexin gehört zu einer Proteinfamilie, die auch die bakteriellen Subtilisine und Subtilisin-ähnliche Proteasen der Säugetiere mit umfaßt. Diese Endoproteasen spalten ihre Substrate C-terminal von gepaarten basischen Aminosäuren (Fuller *et al.*, 1989).

Die in dieser Arbeit hergestellten Expressionskonstrukte pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ enthalten die Sequenz des MBP, gefolgt von einer optimierten Erkennungssequenz der Endoprotease Furin (Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg-Ser) und den cDNAs von ErbB2₁₋₂₂₂ bzw. reifem GrB. Ein weiteres Konstrukt bestand aus den Sequenzen der Gluthation-S-transferase, der Furin-Erkennungssequenz und GrB (pPIC9-GST-furS-GrB). ErbB2₁₋₂₂₂ wurde hier als Modellprotein ausgewählt, da es grundsätzlich in *Pichia pastoris* exprimierbar ist (Gerstmayer *et al.*, 1997) und auch im Rahmen dieser Arbeit als rekombinantes Protein eingesetzt wurde. Der Vektor pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂ (Gerstmayer *et al.*, 1997), der bereits früher zur Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ in der Hefe eingesetzt wurde, diente als Referenzkonstrukt. Zunächst wurde untersucht, ob das modifizierte *Pichia* Expressionssystem grundsätzlich zur Generierung von enzymatisch aktivem GrB eignet, was eine Grundvoraussetzung für die Expression von bifunktionalen GrB Fusionsproteinen darstellt.

Durch das in dieser Arbeit entwickelte System konnte bei der Expression von ErbB2 und GrB in *Pichia pastoris* die Ausbeute dieser Proteine um ein Vielfaches gesteigert werden.

Expressionsklone, die mit den Konstrukten pPIC9-MBP-furS-GrB bzw. pPIC9-MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ transformiert waren, lieferten nach der Induktion deutlich höhere Proteinmengen in den

Kulturüberständen als Hefen, die mit den Referenzkonstrukten pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂ bzw. pPIC9-GrB transformiert waren. Um die exprimierten Proteinmengen miteinander zu vergleichen, wurden Western blot Analysen mit Hefekulturüberständen induzierter Kulturen durchgeführt. Dabei wurden täglich Proben zur Messung der Zelldichte und zur Analyse der Proteinexpression entnommen. Die Kulturüberstände wurden abzentrifugiert und im Western blot mit dem mAk FRP5 auf Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ bzw. mit dem mAk 2C5 auf Expression von GrB untersucht. Die detektierten Banden wurden mit dem Programm ImageJ 1.32j (NCBI) durch Messen der mittleren Grauwerte (MGV, „mean grey values“) quantifiziert.

Durch N-terminale Fusion der MBP-furS Domäne konnte die GrB Ausbeute im Kulturüberstand nach dreitägiger Induktion etwa um das neunfache gesteigert werden. Nach viertägiger Induktion wurde mit dieser Methode der Quantifizierung eine Ausbeutesteigerung um den Faktor sieben gemessen. Der mit pPIC9-GST-furS-GrB transformierte Hefeklon hingegen exprimierte GrB nur in geringen Mengen. Bei der Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ war ebenfalls ein erheblicher Effekt der MBP-furS Domäne auf die ErbB2₁₋₂₂₂ Ausbeute meßbar. Der MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ Expressionsklon lieferte nach dreitägiger Induktion etwa die vierfache Menge an ErbB2₁₋₂₂₂, nach vier Tagen etwa die dreifache Menge wie der Referenzklon (pPIC9-ErbB2₁₋₂₂₂). Eine Abhängigkeit dieser durch die MBP-furS Domäne erzielten Expressionsverstärkung von unterschiedlichen Wachstumskinetiken der Hefeklone konnte ausgeschlossen werden. Allerdings ist hier festzustellen, daß die verwendete Methode, Proteinmengen in Hefekulturüberständen miteinander zu vergleichen, den Nachteil aufweist, daß starke Signale zu einer maximalen Schwärzung des Films führen, tendenziell also als zu schwach gemessen werden. Aus diesem Grunde sind die nach dreitägiger Induktion gemessenen relativen Werte sicherlich zuverlässiger als die Werte, die nach viertägiger Induktion gemessen wurden.

Neben den beobachteten erheblichen Ausbeutesteigerungen durch Fusion der MBP-furS Domäne war auch eine vollständige posttranslationale Prozessierung der MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ und MBP-furS-GrB Fusionsproteine nachweisbar. In Western blot Analysen von Hefekulturüberständen wurden mit anti-ErbB2 bzw. anti-GrB Antikörpern ausschließlich Proteine mit einem Molekulargewicht detektiert, das dem von freiem ErbB2₁₋₂₂₂ bzw. GrB entsprach. Die Spaltung erfolgte dabei offensichtlich wie erwartet innerhalb der Erkennungssequenz der Protease Furin (furS), da auch freies MBP in den Überständen nachgewiesen wurde. Im Falle des MBP-furS-GrB Fusionsproteins führte die Deletion des Serin innerhalb der Furin-Spaltstelle dazu, daß das Protein nicht mehr vollständig gespalten werden konnte, neben GrB also auch MBP-fur-GrB als vollständiges Protein in den Kulturüberständen induzierter Hefekulturen detektierbar war.

Die durch N-terminale Fusion der MBP-furS Domäne an GrB oder ErbB2₁₋₂₂₂ erreichten, um ein vielfaches erhöhten Ausbeuten zeigen, daß diese Domäne als Expressionsverstärker im Kontext der hier konstruierten Fusionsproteine agiert. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt auf Ebene der Transkription, der Translation oder posttranslational wirkt, wurde die GrB mRNA Expression in den verwendeten Hefeklonen analysiert. Hierfür wurden quantitative TaqMan PCR Analysen durchgeführt. Es konnten

keine signifikanten Unterschiede in der GrB mRNA Expression gemessen werden, die den expressionsverstärkenden Effekt der MBP-furS Domäne erklären können. Ein transkriptioneller Effekt der MBP-furS Domäne kann daher ausgeschlossen werden, was bedeutet, daß die MBP-furS Domäne auf translationaler oder posttranslationaler Ebene wirkt. Bei der Analyse der intrazellulären Fraktion von Hefeklonen, die mit pPIC9-GrB, pPIC9-MBP-furS-GrB bzw. pPIC9-GST-furS-GrB transformiert waren, war im Falle des pPIC9-GrB Expressionsklons eine intrazelluläre Akkumulation von GrB detektierbar. Die mit pPIC9-MBP-furS-GrB und pPIC9-GST-furS-GrB transformierten Klone zeigten diese Akkumulation nicht. Dies könnte bedeuten, daß akkumuliertes GrB nicht in korrekt gefalteter Konformation vorlag. Proteine, die sekretiert werden, werden zunächst in das ER importiert und von dort aus zum Golgi Apparat transportiert, von wo aus die Sekretion erfolgt. Für den vesikulären Transport müssen die Proteine korrekt gefaltet sein. Das zelluläre System, das die Faltung von Proteinen auch in der Hefe überwacht, wird als „ER quality control“ bezeichnet (Ellgaard und Helenius, 2003; Kostova und Wolf, 2003). Falsch gefaltete Proteine werden im ER zurückgehalten und akkumulieren dort, oder sie werden durch das Ubiquitin-Proteasom System abgebaut.

Die beobachtete intrazelluläre Proteinakkumulation von GrB muß zu einer verringerten Menge an sekretiertem GrB im Hefekulturüberstand führen. Bei dem MBP-furS-GrB Fusionskonstrukt war keine Akkumulation rekombinanter Proteine im Zellinneren detektierbar (Abb. 3.26), was eine mögliche Erklärung für die durch die MBP-furS Domäne vermittelte Ausbeutesteigerung liefern könnte. Dies würde bedeuten, daß die MBP-furS Domäne die korrekte Faltung der GrB Domäne fördert, wodurch eine effizientere Sekretion ermöglicht wird. Im Kontext des hier konstruierten Fusionsproteins MBP-furS-GrB wirkt MBP also als Chaperon. Dieser Effekt erfolgt, wie durch die quantitativen PCR-Analysen gezeigt, auf translationaler oder posttranslationaler Ebene.

Zur Messung der enzymatischen Aktivität von GrB in den Kulturüberständen induzierter Expressionskulturen wurden colorimetrische Peptidspaltungsassays mit dem synthetischen GrB Substrat Ac-IETD-pNA durchgeführt. Hierbei zeigte sich, daß GrB, welches durch den mit pPIC9-MBP-furS-GrB transformierten Klon exprimiert wurde, keine enzymatische Aktivität aufwies. Im Gegensatz dazu war in Vergleichskulturen, in denen Hefen mit dem Referenzkonstrukt pPIC9-GrB transformiert waren, GrB Aktivität nachweisbar. GrB wird durch cytotoxische Lymphocyten als Prä-Proenzym synthetisiert und erlangt erst nach Abspaltung von Signalpeptid und inhibitorischem Dipeptid enzymatische Aktivität. Aus diesem Grunde lag die Vermutung nahe, daß das Serin innerhalb der furS-Sequenz, das nach Spaltung durch Furin theoretisch am N-Terminus von GrB zurückbleiben sollte (vgl. Abb. 3.27 C), die enzymatische Aktivität der Serinprotease inhibiert. Ein Hefeklon, der mit einem Vergleichskonstrukt transformiert war, in dem das Serin innerhalb der Furin-Erkennungssequenz deletiert war (fur), exprimierte enzymatisch aktives GrB.

Da sich beide Konstrukte, MBP-furS-GrB und MBP-fur-GrB, nur durch das Serin innerhalb der Furin-Schnittstelle unterschieden, zeigen diese Daten, daß dieses Serin die enzymatische Aktivität von GrB blockiert. GrB, das als MBP-fur-GrB Fusionsprotein exprimiert wurde, war zwar enzymatisch aktiv,

wurde allerdings nicht mehr vollständig prozessiert. In Kulturüberständen von Expressionskulturen, die mit pPIC9-MBP-fur-GrB transformiert waren, war neben prozessiertem GrB auch ein deutlicher Anteil des ungespaltenen MBP-fur-GrB Fusionsproteins detektierbar. Dies bedeutet, daß die veränderte Furin-Schnittstelle (Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg) kein optimales Substrat des Furin Homologs in Hefe darstellt. Da die enzymatische Aktivität von GrB durch das N-terminale Serin offensichtlich vollständig inhibiert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter versucht, die Ausbeute an GrB Fusionsproteinen durch N-terminale Fusion mit der MBP-furS zu steigern. Für Proteine, die ein N-terminales Serin tolerieren, stellt das hier entwickelte System allerdings eine Strategie dar, um die Ausbeute bei der heterologen Expression in *Pichia pastoris* um ein Vielfaches zu steigern.

Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit auch für ErbB2₁₋₂₂₂ gezeigt werden. Weitere, hier nicht gezeigte Daten, die z. T. in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Weth in unserer Gruppe erarbeitet wurden, weisen außerdem darauf hin, daß das hier entwickelte System auch bei der Expression rekombinanter Proteine in *E. coli* sowie in Säugerzellen zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung bei gleichzeitiger *in vivo* Prozessierung der MBP-furS Domäne führen kann. In einem Pilotexperiment führte die N-terminale Fusion der MBP-furS Domäne bei der Expression von ErbB2₁₋₂₂₂ in *E. coli* nach der Sekretion des Fusionsproteins durch das Signalpeptid des „outer membrane protein A“ von *E. coli* (*ompA*) zu einer deutlichen Ausbeutesteigerung an löslichem ErbB2₁₋₂₂₂ im periplasmatischen Raum (Daten nicht gezeigt). Daß durch N-terminale Fusion von MBP die Ausbeute verschiedener Proteine in *E. coli* erheblich gesteigert werden kann, wurde bereits in zahlreichen Arbeiten gezeigt (Hayhurst, 2000; Jacquet *et al.*, 1999; Pryor und Leiting, 1997; Yoda *et al.*, 2000). Daher war ein solcher Effekt des MBP auch bei der Expression von MBP-furS-ErbB2₁₋₂₂₂ in *E. coli* zu erwarten. Die Nutzung einer endogen kodierten Protease, die das MBP vom Fusionspartner trennt, stellt allerdings auch in *E. coli* einen neuen Ansatz dar. Der potentielle Nachteil, der sonst durch Fusion von Proteinen mit MBP entsteht, nämlich die Notwendigkeit der Abspaltung des MBP *in vitro*, entfällt durch die Prozessierung *in vivo*. Mögliche Endoproteasen, die in *E. coli* die Furin-Erkennungssequenz spalten, sind die bakteriellen Subtilisine, die aufgrund ähnlicher Substratspezifität wahrscheinlich auch Furin- bzw. Kexin-Substrate spalten.

Weitere Daten, die in Zusammenarbeit mit Dr. Robert Weth erarbeitet wurden, zeigen, daß durch N-terminale Fusion der MBP-furS Domäne auch in Vero Affennierenfibroblastenzellen die Ausbeute eines sekretierten Fusionsproteins im Vergleich zum unfusionierten Protein um ein Vielfaches gesteigert werden kann (Daten nicht gezeigt). Ein auf diese Weise exprimiertes Protein war ein Fusionsprotein bestehend aus der CD28-Bindungsdomäne des humanen CD86 (CD86₁₁₁), den „hinge“- , CH2- und CH3-Domänen des humanen IgG1 und scFv(FRP5) (Biburger *et al.*, 2005), das N-terminal mit der MBP-furS Domäne fusioniert war. Dieses Protein wurde durch das CD86 Signalpeptid in den Kulturüberstand geleitet. Bei der Verwendung des Igk Signalpeptids hingegen konnte diese Ausbeutesteigerung vermittelt durch die MBP-furS Domäne nicht erzielt werden.

Das Prinzip der Ausbeutesteigerung, nämlich die N-terminale Fusion eines „solubilizing agent“, das posttranslational *in vivo* durch Nutzung einer endogen kodierten Protease abgespalten wird, wurde

meiner Kenntnis nach in dieser Arbeit erstmals verwendet und könnte generell eine neue Strategie der Ausbeutesteigerung bei der Expression rekombinanter Proteine darstellen.

4.4 AIF als caspasenunabhängiger Effektor in humanisierten Immuntoxinen

Als alternativer Effektor in Antikörperfusionsproteinen wurde im Rahmen dieser Arbeit auch das Flavoprotein „apoptosis inducing factor“ (AIF) als Caspasen-unabhängig agierendes proapoptotisches Signalmolekül eingesetzt. Ein Fusionsprotein, das unabhängig von der Aktivität von Caspasen Zelltod induzieren kann, könnte grundlegende Resistenzmechanismen, die durch Inaktivierung von Caspasen auftreten, umgehen. So trägt die Inhibition oder Inaktivierung von Caspasen durch Tumorzellen zur Therapieresistenz bei (Faderl und Estrov, 2001; Fulda und Debatin, 2002; Svingen *et al.*, 2000). Der Erfolg einer antitumoralen Therapie hängt offenbar sogar von der Fähigkeit des verwendeten Cytostatikums ab, Caspasen zu aktivieren (Lockshin, 2004). Resistenz gegenüber Cytostatika wird z. B. durch die verminderte Expression einzelner Caspasen aufgrund epigenetischer Änderungen (Estrov *et al.*, 1998; Fulda *et al.*, 2001a; Fulda *et al.*, 2001b; Koomagi und Volm, 2000; Teitz *et al.*, 2000) oder durch Mutationen in Caspaseexons verursacht (Janicke *et al.*, 1998).

Zu Beginn der hier dargestellten Arbeiten mit AIF Fusionsproteinen, war die Rolle, die AIF in apoptotischen Signalwegen einnimmt, noch weitgehend unklar. Heute erscheint es jedoch gesichert, daß die Freisetzung von AIF aus dem mitochondrialen Membranraum, in dem AIF bei gesunden Zellen lokalisiert ist, zur caspasenunabhängigen Induktion von Apoptose führt.

Diese Freisetzung von AIF aus dem Intermembranraum ermöglicht die nachfolgende Translokation von AIF in den Zellkern, wo AIF zur peripheren Chromatinkondensation und DNA-Fragmentierung führt. Die molekularen Mechanismen der durch AIF vermittelten DNA-Fragmentierung sind nicht bekannt. Bindung von AIF an die chromosomale DNA ist aber für die apoptotische Aktivität erforderlich (Ye *et al.*, 2002). Cytosolisches AIF bewirkt die Freisetzung weiterer AIF-Moleküle und anderer proapoptotischer Faktoren wie Cytochrom *c* aus den Mitochondrien (Susin *et al.*, 1999), was allerdings von zusätzlichen, bisher unbekannten cytosolischen Faktoren abhängig ist. Neben der Apoptoseinduktion durch Schädigung der nukleären DNA agiert AIF offensichtlich auch als proapoptotisches Signalmolekül im Cytosol, was zu einer Verstärkung der apoptotischen Aktivität von AIF führt. Eine solche Signalverstärkung ist eine entscheidende Eigenschaft eines Effektors in Antikörperfusionsproteinen, da die Effekorkonzentrationen, die mit einem solchen Antikörper-basierten Ansatz intrazellulär erreicht werden können, limitiert sind.

Da AIF in apoptotischen Zellen ohne N-terminales mitochondriales Lokalisationssignal freigesetzt wird und in dieser Form proapoptotisch wirkt (Susin *et al.*, 1999), wurde in den in dieser Arbeit beschriebenen Fusionsproteinen diese verkürzte Form des AIF (AIF_{Δ1-100}) eingesetzt. In diesen Fusionsproteinen war die Sequenz des AIF N-terminal mit dem ErbB2 spezifischen scFv(FRP5) Antikörper fusioniert, um Spezifität für ErbB2 exprimierende Tumorzellen zu erreichen. Zur Induktion von Apoptose muß AIF in das Cytosol bzw. den Zellkern gelangen. Um eine cytosolische Translokation

von AIF zu erreichen, wurde in dem Konstrukt 5-E-AIF die Translokationsdomäne von *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin A eingefügt. Diese Domäne ist im Wildtyp-Toxin notwendig für den retrograden Transport vom Endosom über Golgi Apparat und endoplasmatisches Retikulum in das Cytosol. Das in dieser Arbeit exprimierte Fusionsprotein 5-E-AIF ähnelt vom modularen Aufbau her dem Immuntoxin scFv(FRP5)-ETA, das neben dem Antikörperfragment scFv(FRP5) und der Exotoxin A Translokationsdomäne auch die katalytisch aktive Domäne des Toxins enthält. Da diese katalytische Exotoxin A Domäne im hier konstruierten Protein gegen AIF_{Δ1-100}, einer Domäne humanen Ursprungs, ausgetauscht ist, kann es im Prinzip als partiell „humanisiertes Immuntoxin“ bezeichnet werden.

Die in dieser Arbeit abgeleiteten AIF-Fusionsproteine 5-AIF, 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/K194A} konnten in *E. coli* in großen Mengen exprimiert werden, lagen jedoch hauptsächlich in Form unlöslicher „inclusion bodies“ vor. Die Proteine wurden denaturiert, via Ni²⁺-Affinitätschromatographie gereinigt und geeignete Renaturierungsbedingungen etabliert, um die Proteine in ihre aktive Konformation zurückzufalten. In durchflußcytometrischen Analysen konnte gezeigt werden, daß die AIF-Fusionsproteine spezifisch an ErbB2 auf der Oberfläche von Tumorzellen binden. Die Funktionalität der AIF-Domäne wurde in einem elektrophoretischem Mobilitätsshiftassay untersucht, in dem AIF mit den DNA-Fragmenten eines DNA-Größenstandards elektroneutrale Komplexe bildete, die keine elektrophoretische Mobilität im elektrischen Feld besaßen. Die sequenzunspezifische Bindung von AIF an DNA wird durch die Präsenz basischer Aminosäureseitenketten auf der Oberfläche von AIF bewirkt und ist entscheidend für die proapoptotische Aktivität des Flavoproteins (Ye *et al.*, 2002).

Immunfluoreszenzexperimente, in denen ErbB2 positive A-431 Zellen mit AIF-Fusionsproteinen inkubiert wurden, zeigen, daß die Proteine innerhalb weniger Stunden internalisiert werden. Die inhomogene punktuelle Färbung der internalisierten Fusionsproteine läßt, wie oben für die GrB Fusionsproteine beschrieben, auf eine Lokalisation in membranumschlossenen Vesikeln schließen. Der zur Detektion der AIF-Fusionsproteine verwendete mAk M2 erkennt das FLAG Epitop am N-Terminus des scFv(FRP5). Aus diesem Grunde kann mit diesen mikroskopischen Analysen jedoch keine genaue Aussage über die Lokalisation der AIF-Domäne gemacht werden.

Bei korrekter Funktionsweise sollte die bakterielle Translokationsdomäne von 5-E-AIF durch die endosomale Protease Furin gespalten werden. Nach der Spaltung ist weiterhin die Detektion der scFv(FRP5) Domäne möglich, nicht jedoch die Identifizierung der Lokalisation der AIF Domäne. Um eine potentielle Kernlokalisation der AIF-Domäne zu analysieren, ist ein AIF spezifischer Antikörper notwendig. Ein hierzu geeigneter Antikörper steht jedoch gegenwärtig nicht zur Verfügung.

Die AIF-Fusionsproteine 5E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/K194A}, nicht jedoch das 5-AIF Fusionsprotein, in dem die Translokationsdomäne des bakteriellen Exotoxin A fehlt, waren gegenüber ErbB2 exprimierenden A-431 Vulvakarzinomzellen cytotoxisch aktiv. Diese Cytotoxizität war vergleichbar mit der des rekombinanten Immuntoxins scFv(FRP5)-ETA, das in MTT-Assays als Kontrolle eingesetzt wurde. Bei Proteinkonzentrationen der Fusionsproteine 5-E-AIF und 5-E-AIF_{R192A/K194A} von 100 ng/ml zeigten A-431 Zellen nach 72 h eine Überlebensrate von 23 % (5-E-AIF) bzw. 18 % (5-E-AIF_{R192A/K194A}).

in MTT-Assays. Diese cytotoxische Aktivität der AIF-Fusionsproteine war allerdings trotz Translokationsdomäne nur in Gegenwart des endosomolytischen Reagenz Chloroquin gegeben.

In den MTT-Assays wurde nicht untersucht, inwieweit die cytotoxische Aktivität der Fusionsproteine von der Präsenz des Zielrezeptors ErbB2 abhängt. Dies könnte durch die Verwendung ErbB2-negativer Zellen oder mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten mit dem parentalen mAk FRP5 untersucht werden. Die durchflußcytometrischen Analysen, die mit den AIF-Fusionsproteinen durchgeführt wurden und bei denen auch ErbB2-negative Renca-lacZ Zellen eingesetzt wurden, zeigen jedoch, daß AIF spezifisch an den Zielrezeptor ErbB2 auf der Zelloberfläche bindet. Zudem lassen die in den MTT-Assays gemessenen hohen cytotoxischen Aktivitäten der AIF-Fusionsproteine auf einen spezifischen Aufnahmemechanismus der AIF-Fusionsproteine schließen, da derart hohe Aktivitäten bei einem unspezifischen Aufnahmemechanismus nicht zu erwarten sind. Funktionelle Analysen mit den in dieser Arbeit konstruierten AIF-Fusionsproteinen, bei denen auch die Abhängigkeit der cytotoxischen Aktivität dieser Proteine von der Präsenz des Zielrezeptors ErbB2 untersucht wird, werden derzeit von Hayat Mahmud in unserer Arbeitsgruppe weitergeführt.

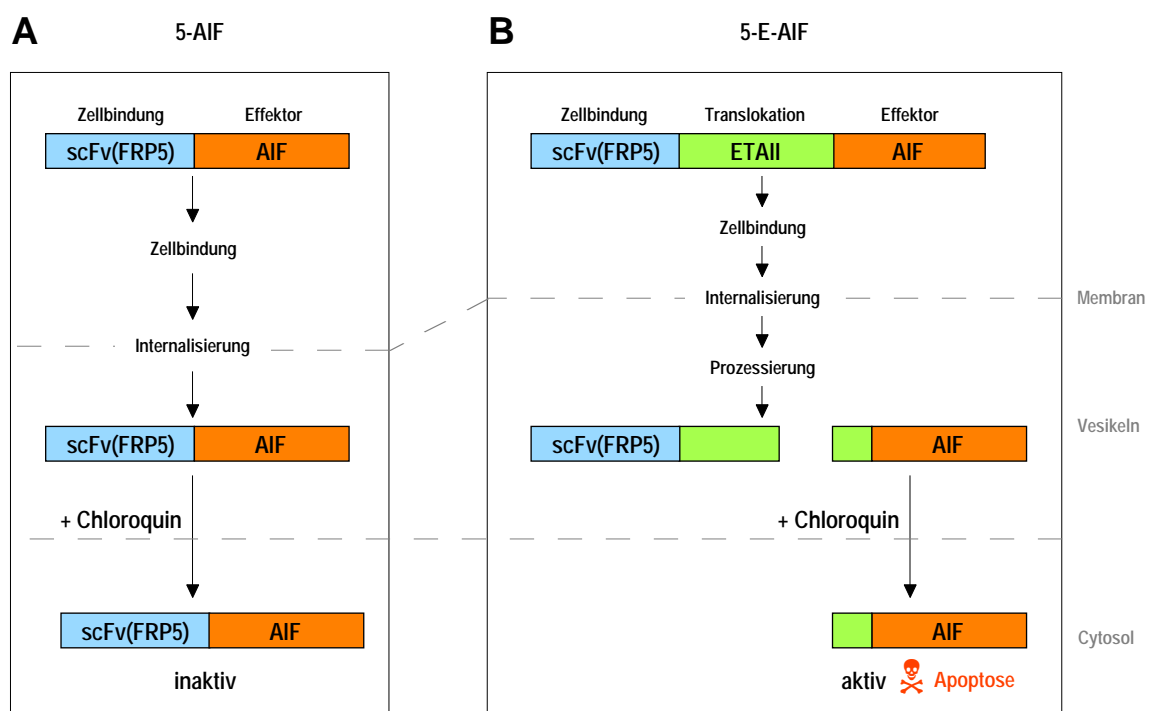


Abb. 3.2 | **Modell der Funktionsweise von AIF Fusionsproteinen.** (A) Das AIF-Fusionsprotein 5-AIF wird nach Zellbindung über ErbB2 durch rezeptorvermittelte Endocytose aufgenommen und durch das endosomolytische Reagenz Chloroquin aus dem endosomalen Kompartiment freigesetzt. Im Cytosol von Zielzellen induziert das Protein keine Apoptose, da die proapoptotische Aktivität der AIF Proteindomäne sehr wahrscheinlich durch das scFv(FRP5) Antikörperfragment inhibiert wird. (B) Das AIF Fusionsprotein 5-E-AIF enthält neben scFv(FRP5) und AIF Domänen zusätzlich die Translokationsdomäne des bakteriellen Exotoxin A. Rezeptorbindung und Aufnahme des Fusionsproteins erfolgt analog zu (A). Im endosomalen Kompartiment könnte die durch Furin katalysierte Prozessierung innerhalb der Translokationsdomäne zu einer „Aktivierung“ der AIF Domäne führen. Chloroquin vermittelt dann die Freisetzung der AIF Domäne in das Cytosol. In gespaltenen Form ist AIF sehr wahrscheinlich aktiv und führt zur Induktion von Apoptose (weitere Erläuterungen im Text).

Das AIF-Fusionsprotein 5-E-AIF_{R192A/K194A}, bei dem die HSP70-Bindungsstelle durch Punktmutation von zwei basischen Aminosäuren (R192A, K194A) inaktiviert ist (Gurbuxani *et al.*, 2003; Schmitt *et al.*, 2003), zeigte im Vergleich zu 5-E-AIF, in dem diese Bindungsstelle unverändert ist, keine gesteigerte cytotoxische Aktivität gegenüber A-431 Zellen. Die Bindung von HSP70 an cytosolisches AIF blockiert dessen nukleären Import und vermindert so die proapoptotische Wirkung von Wildtyp-AIF (Gurbuxani *et al.*, 2003). Überexpression von HSP70 durch Tumorzellen trägt zu deren tumorigenem Potential bei und vermittelt Resistenz gegenüber Chemotherapie (Garrido *et al.*, 2003; Jaattela, 1999). Diese antiapoptotische Aktivität von HSP70 ist allerdings nicht nur auf die Blockade des nukleären Imports von AIF sondern auch auf zwei weitere antiapoptotische Aktivitäten des Hitzeschockproteins zurückzuführen. HSP70 verhindert zusammen mit HSP27 die Rekrutierung von Procaspase-9 zum Apoptosom (Beere *et al.*, 2000). Außerdem ist HSP70 in der proteasomalen Degradation verschiedener apoptotischer Signalmoleküle involviert (Garrido *et al.*, 2003). Der fehlende Unterschied in der Cytotoxizität von 5-E-AIF_{R192A/K194A} und 5-E-AIF könnte darin begründet liegen, daß HSP70 in A-431 Zellen nicht in ausreichender Menge vorlag, um den nukleären Import der eingebrachten exogenen AIF-Moleküle zu verhindern. Darüber hinaus agiert AIF auch im Cytosol als proapoptotisches Signalmolekül, da es die Freisetzung von anderen apoptotischen Signalmolekülen wie z. B. auch von endogenem AIF aus dem mitochondrialen Intermembranraum fördert.

Die Daten der Cytotoxizitätsassays zeigen auch, daß die bakterielle Translokationsdomäne für die cytotoxische Aktivität der AIF-Fusionsproteine erforderlich ist, für die Translokation von AIF in das Cytosol aber vermutlich nicht ausreicht. Hierfür wird zusätzlich das endosomolytische Reagenz Chloroquin benötigt. Chloroquin wurde in diesem Metabolisierungsassay in einer Konzentration (100 µM) verwendet, die bei A-431 Zellen für den „endosome escape“ des GrB-5 Fusionsproteins ausreichend war. Das AIF-Fusionsprotein 5-AIF zeigt jedoch im Gegensatz zum GrB-5 Fusionsprotein in Gegenwart von Chloroquin keinen cytotoxischen Effekt. Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß Chloroquin zwar die Translokation von 5-AIF in das Cytosol bewirken kann, cytosolisches 5-AIF aber keine proapoptotische Aktivität besitzt. Im Gegensatz hierzu sind beide AIF-Fusionsproteine, die die bakterielle Translokationsdomäne beinhalten, cytotoxisch aktiv. Wie beschrieben wird Wildtyp-Exotoxin A nach der Internalisierung innerhalb der Translokationsdomäne gespalten. Für die Translokation der katalytischen Domäne vom endosomalen Kompartiment in das Cytosol ist ein C-terminales ER-Retentionssignal erforderlich (Chaudhary *et al.*, 1990), welches als intrazelluläres „targeting“-Signal dient und in der Zielzelle einen retrograden Toxintransport über den Golgi Apparat und das endoplasmatische Retikulum ermöglicht. Die erhaltenen Ergebnisse lassen sich so interpretieren, daß die N-terminale scFv(FRP5) Proteindomäne die proapoptotische Aktivität von AIF verhindert. Die Translokationsdomäne des Exotoxin A, die notwendig für die cytotoxische Aktivität der AIF-Fusionsproteine ist, kann hier nicht als „endosome escape“ Funktion agieren, weil ein C-terminales KDEL-Signal fehlt. Allerdings scheint sie für die „Aktivierung“ der AIF-Domäne durch die endosomale Protease Furin erforderlich zu sein. Die eigentliche Translokation wird dann durch das endosomolytische

Reagenz Chloroquin bewirkt. Diese Hypothese wurde durch Mikroinjektionsexperimente mit humanen HeLa Cervix-Adenokarzinomzellen bestätigt, bei denen AIF-Fusionsproteine in das Cytosol injiziert wurden. HeLa Zellen wurden verwendet, da die Inkubation von isolierten HeLa Zellkernen mit rekombinantem AIF_{Δ1-100} zur ausgeprägten Chromatinkondensation führt (Susin *et al.*, 1999). Diese Zellen sind also offensichtlich gut geeignet, um anhand der Kernmorphologie die cytotoxische Aktivität von AIF zu untersuchen. In den Mikroinjektionsexperimenten war kein cytotoxischer Effekt der AIF-Fusionsproteine zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß die scFv(FRP5) Domäne in der Tat die proapoptotische Aktivität der AIF Domäne inhibiert.

Um weitere Hinweise auf die Funktion von AIF Fusionsproteinen zu erhalten, wird derzeit von Hayat Mahmud in unserer Arbeitsgruppe ein unfusioniertes AIF_{Δ1-100} Kontrollprotein abgeleitet, welches in Mikroinjektionsexperimenten auf seine cytotoxische Aktivität untersucht werden soll. Zudem wird ein 5-E-AIF Fusionsprotein abgeleitet, das am C-Terminus ein ER-Retentionssignal (KDEL) besitzt. Dieses Protein sollte unabhängig vom endosomolytischen Reagenz Chloroquin Apoptose in ErbB2 exprimierenden Tumorzellen induzieren können, sofern damit ein dem katalytischen Fragment von Exotoxin A entsprechendes intrazelluläres „routing“ der AIF Domäne erreicht werden kann.

Ziel dieser Arbeit war es, Proteine apoptotischer Signalkaskaden zu nutzen, um selektiv in Tumorzellen Apoptose zu induzieren. Dieses Ziel wurde mit den beiden prototypischen Fusionsproteinen GrB-5 und GrB-T erreicht. Diese Proteine zeigen *in vitro* eine hohe und selektive cytotoxische Aktivität gegenüber Tumorzellen, die den entsprechenden Zielrezeptor überexprimieren. Mit Fusionsproteinen, in denen AIF als alternative Effektor-domäne eingesetzt wurde, konnte dieses Flavoprotein spezifisch in Tumorzellen eingeschleust werden. Hierbei wurden vielversprechende Daten erhalten, die eine Weiterführung dieses Ansatzes als sinnvoll erscheinen lassen.

Zusammenfassend zeigen die in dieser Arbeit erhaltenen Daten, daß das selektive Einbringen proapoptotischer Effektormoleküle in Tumorzellen in der Tat ausreichend ist, diese malignen Zellen durch Induktion von Apoptose abzutöten. Eine weitere Analyse der in dieser Arbeit abgeleiteten Fusionsproteine *in vivo* erscheint daher sinnvoll.

5 Literatur

- Acehan, D., Jiang, X., Morgan, D. G., Heuser, J. E., Wang, X., and Akey, C. W. (2002). Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 9, 423-432.
- Adrain, C., Murphy, B. M., and Martin, S. J. (2004). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the CTL/NK protease granzyme B. *J Biol Chem*.
- Alarcon-Vargas, D., and Ronai, Z. (2002). p53-Mdm2--the affair that never ends. *Carcinogenesis* 23, 541-547.
- Alimonti, J. B., Shi, L., Baijal, P. K., and Greenberg, A. H. (2001). Granzyme B induces BID-mediated cytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem* 276, 6974-6982.
- Allen, T. M. (2002). Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2, 750-763.
- Andrade, F., Casciola-Rosen, L. A., and Rosen, A. (2004). Granzyme B-induced cell death. *Acta Haematol* 111, 28-41.
- Artega, C. L. (2003). ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. *Exp Cell Res* 284, 122-130.
- Ashcroft, M., Taya, Y., and Vousden, K. H. (2000). Stress signals utilize multiple pathways to stabilize p53. *Mol Cell Biol* 20, 3224-3233.
- Ashkenazi, A. (2002). Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2, 420-430.
- Atkinson, E. A., Barry, M., Darmon, A. J., Shostak, I., Turner, P. C., Moyer, R. W., and Bleackley, R. C. (1998). Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B. *J Biol Chem* 273, 21261-21266.
- Azar, Y., and Lorberboum-Galski, H. (2000). GnRH-Bik/Bax/Bak chimeric proteins target and kill adenocarcinoma cells; the general use of pro-apoptotic proteins of the Bcl-2 family as novel killing components of targeting chimeric proteins. *Apoptosis* 5, 531-542.
- Azemar, M., Djahansouzi, S., Jager, E., Solbach, C., Schmidt, M., Maurer, A. B., Mross, K., Unger, C., von Minckwitz, G., Dall, P., *et al.* (2003). Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res Treat* 82, 155-164.
- Bach, H., Mazor, Y., Shaky, S., Shoham-Lev, A., Berdichevsky, Y., Gutnick, D. L., and Benhar, I. (2001). Escherichia coli maltose-binding protein as a molecular chaperone for recombinant intracellular cytoplasmic single-chain antibodies. *J Mol Biol* 312, 79-93.
- Bargonetti, J., and Manfredi, J. J. (2002). Multiple roles of the tumor suppressor p53. *Curr Opin Oncol* 14, 86-91.
- Barry, M., and Bleackley, R. C. (2002). Cytotoxic T lymphocytes: all roads lead to death. *Nat Rev Immunol* 2, 401-409.
- Barry, M., Heibei, J. A., Pinkoski, M. J., Lee, S. F., Moyer, R. W., Green, D. R., and Bleackley, R. C. (2000). Granzyme B short-circuits the need for caspase 8 activity during granule-mediated cytotoxic T-lymphocyte killing by directly cleaving Bid. *Mol Cell Biol* 20, 3781-3794.
- Baselga, J., Gianni, L., Geyer, C., Perez, E. A., Riva, A., and Jackisch, C. (2004). Future options with trastuzumab for primary systemic and adjuvant therapy. *Semin Oncol* 31, 51-57.
- Bayer, E. A., Ben-Hur, H., Hiller, Y., and Wilchek, M. (1989). Postsecretory modifications of streptavidin. *Biochem J* 259, 369-376.
- Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Taylor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., and Green, D. R. (2000). Heat-shock protein 70 inhibits apoptosis by preventing recruitment of procaspase-9 to the Apaf-1 apoptosome. *Nat Cell Biol* 2, 469-475.
- Beerli, R. R., and Hynes, N. E. (1996). Epidermal growth factor-related peptides activate distinct subsets of ErbB receptors and differ in their biological activities. *J Biol Chem* 271, 6071-6076.
- Ben-Yehudah, A., Aqeilan, R., Robashkevich, D., and Lorberboum-Galski, H. (2003). Using apoptosis for targeted cancer therapy by a new gonadotropin releasing hormone-DNA fragmentation factor 40 chimeric protein. *Clin Cancer Res* 9, 1179-1190.
- Ben-Yehudah, A., and Lorberboum-Galski, H. (2004). Targeted cancer therapy with gonadotropin-releasing hormone chimeric proteins. *Expert Rev Anticancer Ther* 4, 151-161.

- Beresford, P. J., Zhang, D., Oh, D. Y., Fan, Z., Greer, E. L., Russo, M. L., Jaju, M., and Lieberman, J. (2001). Granzyme A activates an endoplasmic reticulum-associated caspase-independent nuclease to induce single-stranded DNA nicks. *J Biol Chem* 276, 43285-43293.
- Biburger, M., Weth, R., and Wels, W. S. (2005). A novel bispecific tetravalent antibody fusion protein to target costimulatory activity for T-cell activation to tumor cells overexpressing ErbB2/HER2. *J Mol Biol* 346, 1299-1311.
- Boatright, K. M., Renatus, M., Scott, F. L., Sperandio, S., Shin, H., Pedersen, I. M., Ricci, J. E., Edris, W. A., Sutherlin, D. P., Green, D. R., and Salvesen, G. S. (2003). A unified model for apical caspase activation. *Mol Cell* 11, 529-541.
- Boldin, M. P., Goncharov, T. M., Goltsev, Y. V., and Wallach, D. (1996). Involvement of MACH, a novel MORT1/FADD-interacting protease, in Fas/APO-1- and TNF receptor-induced cell death. *Cell* 85, 803-815.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Browne, K. A., Blink, E., Sutton, V. R., Froelich, C. J., Jans, D. A., and Trapani, J. A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Mol Cell Biol* 19, 8604-8615.
- Browne, K. A., Johnstone, R. W., Jans, D. A., and Trapani, J. A. (2000). Filamin (280-kDa actin-binding protein) is a caspase substrate and is also cleaved directly by the cytotoxic T lymphocyte protease granzyme B during apoptosis. *J Biol Chem* 275, 39262-39266.
- Bryan, T. M., and Cech, T. R. (1999). Telomerase and the maintenance of chromosome ends. *Curr Opin Cell Biol* 11, 318-324.
- Bryan, T. M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., and Reddel, R. R. (1995). Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *Embo J* 14, 4240-4248.
- Buchner, J., and Rudolph, R. (1991). Renaturation, purification and characterization of recombinant Fab-fragments produced in *Escherichia coli*. *Biotechnology (N Y)* 9, 157-162.
- Buckholz, R. G., and Gleeson, M. A. (1991). Yeast systems for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology (N Y)* 9, 1067-1072.
- Buzza, M. S., Hirst, C. E., Bird, C. H., Hosking, P., McKendrick, J., and Bird, P. I. (2001). The granzyme B inhibitor, PI-9, is present in endothelial and mesothelial cells, suggesting that it protects bystander cells during immune responses. *Cell Immunol* 210, 21-29.
- Cande, C., Cohen, I., Daugas, E., Ravagnan, L., Larochette, N., Zamzami, N., and Kroemer, G. (2002). Apoptosis-inducing factor (AIF): a novel caspase-independent death effector released from mitochondria. *Biochimie* 84, 215-222.
- Cande, C., Vahsen, N., Garrido, C., and Kroemer, G. (2004). Apoptosis-inducing factor (AIF): caspase-independent after all. *Cell Death Differ* 11, 591-595.
- Caputo, A., Garner, R. S., Winkler, U., Hudig, D., and Bleackley, R. C. (1993). Activation of recombinant murine cytotoxic cell proteinase-1 requires deletion of an amino-terminal dipeptide. *J Biol Chem* 268, 17672-17675.
- Caputo, A., James, M. N., Powers, J. C., Hudig, D., and Bleackley, R. C. (1994). Conversion of the substrate specificity of mouse proteinase granzyme B. *Nat Struct Biol* 1, 364-367.
- Cereghino, J. L., and Cregg, J. M. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiol Rev* 24, 45-66.
- Chang, D. W., Xing, Z., Pan, Y., Algeciras-Schimnich, A., Barnhart, B. C., Yaish-Ohad, S., Peter, M. E., and Yang, X. (2002). c-FLIP(L) is a dual function regulator for caspase-8 activation and CD95-mediated apoptosis. *Embo J* 21, 3704-3714.
- Chaudhary, V. K., Jinno, Y., FitzGerald, D., and Pastan, I. (1990). *Pseudomonas* exotoxin contains a specific sequence at the carboxyl terminus that is required for cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 308-312.
- Cheung, N. K., Modak, S., Lin, Y., Guo, H., Zanzonico, P., Chung, J., Zuo, Y., Sanderson, J., Wilbert, S., Theodore, L. J., *et al.* (2004). Single-chain Fv-streptavidin substantially improved therapeutic index in multistep targeting directed at disialoganglioside GD2. *J Nucl Med* 45, 867-877.

- Chinnaiyan, A. M., Hanna, W. L., Orth, K., Duan, H., Poirier, G. G., Froelich, C. J., and Dixit, V. M. (1996). Cytotoxic T-cell-derived granzyme B activates the apoptotic protease ICE-LAP3. *Curr Biol* 6, 897-899.
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., and Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell* 81, 505-512.
- Chiocca, E. A. (2002). Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* 2, 938-950.
- Cho, H. S., Mason, K., Ramyar, K. X., Stanley, A. M., Gabelli, S. B., Denney, D. W., Jr., and Leahy, D. J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. *Nature* 421, 756-760.
- Choy, J. C., Hung, V. H., Hunter, A. L., Cheung, P. K., Motyka, B., Goping, I. S., Sawchuk, T., Bleackley, R. C., Podor, T. J., McManus, B. M., and Granville, D. J. (2004). Granzyme B induces smooth muscle cell apoptosis in the absence of perforin: involvement of extracellular matrix degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 2245-2250.
- Christofori, G., and Semb, H. (1999). The role of the cell-adhesion molecule E-cadherin as a tumour-suppressor gene. *Trends Biochem Sci* 24, 73-76.
- Classen, C. F., Ushmorov, A., Bird, P., and Debatin, K. M. (2004). The granzyme B inhibitor PI-9 is differentially expressed in all main subtypes of pediatric acute lymphoblastic leukemias. *Haematologica* 89, 1314-1321.
- Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G., and Ravetch, J. V. (2000). Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6, 443-446.
- Cotten, M., Langle-Rouault, F., Kiriappos, H., Wagner, E., Mechtler, K., Zenke, M., Beug, H., and Birnstiel, M. L. (1990). Transferrin-polycation-mediated introduction of DNA into human leukemic cells: stimulation by agents that affect the survival of transfected DNA or modulate transferrin receptor levels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4033-4037.
- Cregan, S. P., Dawson, V. L., and Slack, R. S. (2004). Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene* 23, 2785-2796.
- Cregan, S. P., Fortin, A., MacLaurin, J. G., Callaghan, S. M., Cecconi, F., Yu, S. W., Dawson, T. M., Dawson, V. L., Park, D. S., Kroemer, G., and Slack, R. S. (2002). Apoptosis-inducing factor is involved in the regulation of caspase-independent neuronal cell death. *J Cell Biol* 158, 507-517.
- Cregg, J. M., Cereghino, J. L., Shi, J., and Higgins, D. R. (2000). Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* 16, 23-52.
- Cregg, J. M., Vedvick, T. S., and Raschke, W. C. (1993). Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* 11, 905-910.
- Cretney, E., Takeda, K., Yagita, H., Glaccum, M., Peschon, J. J., and Smyth, M. J. (2002). Increased susceptibility to tumor initiation and metastasis in TNF-related apoptosis-inducing ligand-deficient mice. *J Immunol* 168, 1356-1361.
- Cunningham, D., Humblet, Y., Siena, S., Khayat, D., Bleiberg, H., Santoro, A., Bets, D., Mueser, M., Harstrick, A., Verslype, C., *et al.* (2004). Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 351, 337-345.
- Darmon, A. J., Ley, T. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1996). Cleavage of CPP32 by granzyme B represents a critical role for granzyme B in the induction of target cell DNA fragmentation. *J Biol Chem* 271, 21709-21712.
- Darmon, A. J., Nicholson, D. W., and Bleackley, R. C. (1995). Activation of the apoptotic protease CPP32 by cytotoxic T-cell-derived granzyme B. *Nature* 377, 446-448.
- Davis, J. E., Sutton, V. R., Smyth, M. J., and Trapani, J. A. (2000). Dependence of granzyme B-mediated cell death on a pathway regulated by Bcl-2 or its viral homolog, BHRF1. *Cell Death Differ* 7, 973-983.
- Dean, N. M., and Bennett, C. F. (2003). Antisense oligonucleotide-based therapeutics for cancer. *Oncogene* 22, 9087-9096.
- Debatin, K. M., and Krammer, P. H. (2004). Death receptors in chemotherapy and cancer. *Oncogene* 23, 2950-2966.

- Degli-Esposti, M. A., Dougall, W. C., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Smith, C. A., and Goodwin, R. G. (1997a). The novel receptor TRAIL-R4 induces NF-kappaB and protects against TRAIL-mediated apoptosis, yet retains an incomplete death domain. *Immunity* 7, 813-820.
- Degli-Esposti, M. A., Smolak, P. J., Walczak, H., Waugh, J., Huang, C. P., DuBose, R. F., Goodwin, R. G., and Smith, C. A. (1997b). Cloning and characterization of TRAIL-R3, a novel member of the emerging TRAIL receptor family. *J Exp Med* 186, 1165-1170.
- di Guan, C., Li, P., Riggs, P. D., and Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in *Escherichia coli* by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67, 21-30.
- Donepudi, M., Sweeney, A. M., Briand, C., and Grutter, M. G. (2003). Insights into the Regulatory Mechanism for Caspase-8 Activation. *Mol Cell* 11, 543-549.
- Du, C., Fang, M., Li, Y., Li, L., and Wang, X. (2000). Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell* 102, 33-42.
- Duan, H., Orth, K., Chinnaiyan, A. M., Poirier, G. G., Froelich, C. J., He, W. W., and Dixit, V. M. (1996). ICE-LAP6, a novel member of the ICE/Ced-3 gene family, is activated by the cytotoxic T cell protease granzyme B. *J Biol Chem* 271, 16720-16724.
- Edwards, K. M., Kam, C. M., Powers, J. C., and Trapani, J. A. (1999). The human cytotoxic T cell granule serine protease granzyme H has chymotrypsin-like (chymase) activity and is taken up into cytoplasmic vesicles reminiscent of granzyme B-containing endosomes. *J Biol Chem* 274, 30468-30473.
- Ehrmann, M., Ehrle, R., Hofmann, E., Boos, W., and Schlosser, A. (1998). The ABC maltose transporter. *Mol Microbiol* 29, 685-694.
- Ellgaard, L., and Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4, 181-191.
- Enari, M., Sakahira, H., Yokoyama, H., Okawa, K., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (1998). A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature* 391, 43-50.
- Enoksson, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Bu, P., Kropotov, A., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Caspase-2 permeabilizes the outer mitochondrial membrane and disrupts the binding of cytochrome c to anionic phospholipids. *J Biol Chem*.
- Estrov, Z., Thall, P. F., Talpaz, M., Estey, E. H., Kantarjian, H. M., Andreeff, M., Harris, D., Van, Q., Walterscheid, M., and Kornblau, S. M. (1998). Caspase 2 and caspase 3 protein levels as predictors of survival in acute myelogenous leukemia. *Blood* 92, 3090-3097.
- Evan, G. I., Lewis, G. K., Ramsay, G., and Bishop, J. M. (1985). Isolation of monoclonal antibodies specific for human c-myc proto-oncogene product. *Mol Cell Biol* 5, 3610-3616.
- Evan, G. I., and Vousden, K. H. (2001). Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature* 411, 342-348.
- Evan, G. I., Wyllie, A. H., Gilbert, C. S., Littlewood, T. D., Land, H., Brooks, M., Waters, C. M., Penn, L. Z., and Hancock, D. C. (1992). Induction of apoptosis in fibroblasts by c-myc protein. *Cell* 69, 119-128.
- Faderl, S., and Estrov, Z. (2001). The clinical significance of caspase regulation in acute leukemia. *Leuk Lymphoma* 40, 471-481.
- Fahnert, B., Lilie, H., and Neubauer, P. (2004). Inclusion bodies: formation and utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 89, 93-142.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Oh, D. Y., Zhang, D., and Lieberman, J. (2003a). Tumor suppressor NM23-H1 is a granzyme A-activated DNase during CTL-mediated apoptosis, and the nucleosome assembly protein SET is its inhibitor. *Cell* 112, 659-672.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., and Lieberman, J. (2002). HMG2 interacts with the nucleosome assembly protein SET and is a target of the cytotoxic T-lymphocyte protease granzyme A. *Mol Cell Biol* 22, 2810-2820.
- Fan, Z., Beresford, P. J., Zhang, D., Xu, Z., Novina, C. D., Yoshida, A., Pommier, Y., and Lieberman, J. (2003b). Cleaving the oxidative repair protein Ape1 enhances cell death mediated by granzyme A. *Nat Immunol* 4, 145-153.
- Ferguson, K. M., Berger, M. B., Mendrola, J. M., Cho, H. S., Leahy, D. J., and Lemmon, M. A. (2003). EGF activates its receptor by removing interactions that autoinhibit ectodomain dimerization. *Mol Cell* 11, 507-517.

- Fernandes-Alnemri, T., Armstrong, R. C., Krebs, J., Srinivasula, S. M., Wang, L., Bullrich, F., Fritz, L. C., Trapani, J. A., Tomaselli, K. J., Litwack, G., and Alnemri, E. S. (1996). In vitro activation of CPP32 and Mch3 by Mch4, a novel human apoptotic cysteine protease containing two FADD-like domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7464-7469.
- Fischer, U., Janicke, R. U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ* 10, 76-100.
- Formigli, L., Conti, A., and Lippi, D. (2004). "Falling leaves": a survey of the history of apoptosis. *Minerva Med* 95, 159-164.
- Foulds, L. (1954). The experimental study of tumor progression: a review. *Cancer Res* 14, 327-339.
- Frankel, A. E., Kreitman, R. J., and Sausville, E. A. (2000). Targeted toxins. *Clin Cancer Res* 6, 326-334.
- Froelich, C. J., Hanna, W. L., Poirier, G. G., Duriez, P. J., D'Amours, D., Salvesen, G. S., Alnemri, E. S., Earnshaw, W. C., and Shah, G. M. (1996). Granzyme B/perforin-mediated apoptosis of Jurkat cells results in cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase to the 89-kDa apoptotic fragment and less abundant 64-kDa fragment. *Biochem Biophys Res Commun* 227, 658-665.
- Fulda, S., and Debatin, K. M. (2002). IFNgamma sensitizes for apoptosis by upregulating caspase-8 expression through the Stat1 pathway. *Oncogene* 21, 2295-2308.
- Fulda, S., Kufer, M. U., Meyer, E., van Valen, F., Dockhorn-Dworniczak, B., and Debatin, K. M. (2001a). Sensitization for death receptor- or drug-induced apoptosis by re-expression of caspase-8 through demethylation or gene transfer. *Oncogene* 20, 5865-5877.
- Fulda, S., Meyer, E., Friesen, C., Susin, S. A., Kroemer, G., and Debatin, K. M. (2001b). Cell type specific involvement of death receptor and mitochondrial pathways in drug-induced apoptosis. *Oncogene* 20, 1063-1075.
- Fulda, S., Wick, W., Weller, M., and Debatin, K. M. (2002). Smac agonists sensitize for Apo2L/TRAIL- or anticancer drug-induced apoptosis and induce regression of malignant glioma in vivo. *Nat Med* 8, 808-815.
- Fuller, R. S., Brake, A. J., and Thorner, J. (1989). Intracellular targeting and structural conservation of a prohormone-processing endoprotease. *Science* 246, 482-486.
- Fumarola, C., and Guidotti, G. G. (2004). Stress-induced apoptosis: toward a symmetry with receptor-mediated cell death. *Apoptosis* 9, 77-82.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Kofler, M., Jorissen, R. N., Nice, E. C., Burgess, A. W., and Ward, C. W. (2003). The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol Cell* 11, 495-505.
- Garrett, T. P., McKern, N. M., Lou, M., Elleman, T. C., Adams, T. E., Lovrecz, G. O., Zhu, H. J., Walker, F., Frenkel, M. J., Hoyne, P. A., *et al.* (2002). Crystal structure of a truncated epidermal growth factor receptor extracellular domain bound to transforming growth factor alpha. *Cell* 110, 763-773.
- Garrido, C., Schmitt, E., Cande, C., Vahsen, N., Parcellier, A., and Kroemer, G. (2003). HSP27 and HSP70: potentially oncogenic apoptosis inhibitors. *Cell Cycle* 2, 579-584.
- Gerstmayer, B. (1997). Kostimulatorische Fusionsproteine für eine gerichtete Aktivierung tumorspezifischer T-Zellen. Dissertation, Universität Freiburg.
- Gerstmayer, B., Altenschmidt, U., Hoffmann, M., and Wels, W. (1997). Costimulation of T cell proliferation by a chimeric B7-2 antibody fusion protein specifically targeted to cells expressing the erbB2 proto-oncogene. *J Immunol* 158, 4584-4590.
- Giesübel, U. (2003). Entwicklung und funktionelle Charakterisierung rekombinanter Formen der pro-apoptischen Enzyme Granzym B und Caspase-3 zur gezielten Induktion des programmierten Zelltods in Tumorzellen. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Goel, S., Mani, S., and Perez-Soler, R. (2002). Tyrosine kinase inhibitors: a clinical perspective. *Curr Oncol Rep* 4, 9-19.
- Goloubinoff, P., Mogk, A., Zvi, A. P., Tomoyasu, T., and Bukau, B. (1999). Sequential mechanism of solubilization and refolding of stable protein aggregates by a bichaperone network. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 13732-13737.

- Gordon, V. M., Klimpel, K. R., Arora, N., Henderson, M. A., and Leppla, S. H. (1995). Proteolytic activation of bacterial toxins by eukaryotic cells is performed by furin and by additional cellular proteases. *Infect Immun* 63, 82-87.
- Graus-Porta, D., Beerli, R. R., Daly, J. M., and Hynes, N. E. (1997). ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *Embo J* 16, 1647-1655.
- Green, N. M. (1990). Avidin and streptavidin. *Methods Enzymol* 184, 51-67.
- Gribskov, M., and Burgess, R. R. (1983). Overexpression and purification of the sigma subunit of Escherichia coli RNA polymerase. *Gene* 26, 109-118.
- Groner, B., Hartmann, C., and Wels, W. (2004). Therapeutic antibodies. *Curr Mol Med* 4, 539-547.
- Gross, A., McDonnell, J. M., and Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* 13, 1899-1911.
- Gutter, M. G. (2000). Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol* 10, 649-655.
- Gschwind, A., Zwick, E., Prenzel, N., Leserer, M., and Ullrich, A. (2001). Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene* 20, 1594-1600.
- Gu, Y., Sarnecki, C., Fleming, M. A., Lippke, J. A., Bleackley, R. C., and Su, M. S. (1996). Processing and activation of CMH-1 by granzyme B. *J Biol Chem* 271, 10816-10820.
- Guo, Y., Srinivasula, S. M., Druilhe, A., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Caspase-2 induces apoptosis by releasing proapoptotic proteins from mitochondria. *J Biol Chem* 277, 13430-13437.
- Gurbuxani, S., Schmitt, E., Cande, C., Parcellier, A., Hammann, A., Daugas, E., Kouranti, I., Spahr, C., Pance, A., Kroemer, G., and Garrido, C. (2003). Heat shock protein 70 binding inhibits the nuclear import of apoptosis-inducing factor. *Oncogene* 22, 6669-6678.
- Hahne, M., Rimoldi, D., Schroter, M., Romero, P., Schreier, M., French, L. E., Schneider, P., Bornand, T., Fontana, A., Lienard, D., *et al.* (1996). Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274, 1363-1366.
- Hall, P. D., Virella, G., Willoughby, T., Atchley, D. H., Kreitman, R. J., and Frankel, A. E. (2001). Antibody response to DT-GM, a novel fusion toxin consisting of a truncated diphtheria toxin (DT) linked to human granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM), during a phase I trial of patients with relapsed or refractory acute myeloid leukemia. *Clin Immunol* 100, 191-197.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol* 166, 557-580.
- Hanahan, D., and Folkman, J. (1996). Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 86, 353-364.
- Hanahan, D., and Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57-70.
- Harwerth, I. M., Wels, W., Marte, B. M., and Hynes, N. E. (1992). Monoclonal antibodies against the extracellular domain of the erbB-2 receptor function as partial ligand agonists. *J Biol Chem* 267, 15160-15167.
- Hayhurst, A. (2000). Improved expression characteristics of single-chain Fv fragments when fused downstream of the Escherichia coli maltose-binding protein or upstream of a single immunoglobulin-constant domain. *Protein Expr Purif* 18, 1-10.
- Hegde, R., Srinivasula, S. M., Zhang, Z., Wassell, R., Mukattash, R., Cilenti, L., DuBois, G., Lazebnik, Y., Zervos, A. S., Fernandes-Alnemri, T., and Alnemri, E. S. (2002). Identification of Omi/HtrA2 as a mitochondrial apoptotic serine protease that disrupts inhibitor of apoptosis protein-caspase interaction. *J Biol Chem* 277, 432-438.
- Hengartner, M. O. (2000). The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407, 770-776.
- Heusel, J. W., Wesselschmidt, R. L., Shresta, S., Russell, J. H., and Ley, T. J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* 76, 977-987.
- Hickman, E. S., Moroni, M. C., and Helin, K. (2002). The role of p53 and pRB in apoptosis and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 60-66.

- Hinoda, Y., Sasaki, S., Ishida, T., and Imai, K. (2004). Monoclonal antibodies as effective therapeutic agents for solid tumors. *Cancer Sci* *95*, 621-625.
- Ho, J. G., and Middelberg, A. P. (2004). Estimating the potential refolding yield of recombinant proteins expressed as inclusion bodies. *Biotechnol Bioeng* *87*, 584-592.
- Hoffmann, M., Schmidt, M., and Wels, W. (1998). Activation of EGF receptor family members suppresses the cytotoxic effects of tumor necrosis factor-alpha. *Cancer Immunol Immunother* *47*, 167-175.
- Huang, B., Eberstadt, M., Olejniczak, E. T., Meadows, R. P., and Fesik, S. W. (1996). NMR structure and mutagenesis of the Fas (APO-1/CD95) death domain. *Nature* *384*, 638-641.
- Huang, D. C., and Strasser, A. (2000). BH3-Only proteins-essential initiators of apoptotic cell death. *Cell* *103*, 839-842.
- Hughes, D. P., and Crispe, I. N. (1995). A naturally occurring soluble isoform of murine Fas generated by alternative splicing. *J Exp Med* *182*, 1395-1401.
- Hwang, J., Fitzgerald, D. J., Adhya, S., and Pastan, I. (1987). Functional domains of Pseudomonas exotoxin identified by deletion analysis of the gene expressed in E. coli. *Cell* *48*, 129-136.
- Hynes, N. E., and Stern, D. F. (1994). The biology of erbB-2/neu/HER-2 and its role in cancer. *Biochim Biophys Acta* *1198*, 165-184.
- Irmeler, M., Hertig, S., MacDonald, H. R., Sadoul, R., Becherer, J. D., Proudfoot, A., Solari, R., and Tschopp, J. (1995). Granzyme A is an interleukin 1 beta-converting enzyme. *J Exp Med* *181*, 1917-1922.
- Irmeler, M., Thome, M., Hahne, M., Schneider, P., Hofmann, K., Steiner, V., Bodmer, J. L., Schroter, M., Burns, K., Mattmann, C., *et al.* (1997). Inhibition of death receptor signals by cellular FLIP. *Nature* *388*, 190-195.
- Ishizaki, Y., Cheng, L., Mudge, A. W., and Raff, M. C. (1995). Programmed cell death by default in embryonic cells, fibroblasts, and cancer cells. *Mol Biol Cell* *6*, 1443-1458.
- Jaattela, M. (1995). Over-expression of hsp70 confers tumorigenicity to mouse fibrosarcoma cells. *Int J Cancer* *60*, 689-693.
- Jaattela, M. (1999). Escaping cell death: survival proteins in cancer. *Exp Cell Res* *248*, 30-43.
- Jacquet, A., Daminet, V., Haumont, M., Garcia, L., Chaudoir, S., Bollen, A., and Biemans, R. (1999). Expression of a recombinant Toxoplasma gondii ROP2 fragment as a fusion protein in bacteria circumvents insolubility and proteolytic degradation. *Protein Expr Purif* *17*, 392-400.
- Jaenicke, R. (1998). Protein self-organization in vitro and in vivo: partitioning between physical biochemistry and cell biology. *Biol Chem* *379*, 237-243.
- Janicke, R. U., Sprengart, M. L., Wati, M. R., and Porter, A. G. (1998). Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* *273*, 9357-9360.
- Jia, L. T., Zhang, L. H., Yu, C. J., Zhao, J., Xu, Y. M., Gui, J. H., Jin, M., Ji, Z. L., Wen, W. H., Wang, C. J., *et al.* (2003). Specific tumoricidal activity of a secreted proapoptotic protein consisting of HER2 antibody and constitutively active caspase-3. *Cancer Res* *63*, 3257-3262.
- Jiang, X., and Wang, X. (2000). Cytochrome c promotes caspase-9 activation by inducing nucleotide binding to Apaf-1. *J Biol Chem* *275*, 31199-31203.
- Johnstone, R. W., Ruefli, A. A., and Lowe, S. W. (2002). Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. *Cell* *108*, 153-164.
- Joza, N., Susin, S. A., Daugas, E., Stanford, W. L., Cho, S. K., Li, C. Y., Sasaki, T., Elia, A. J., Cheng, H. Y., Ravagnan, L., *et al.* (2001). Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature* *410*, 549-554.
- Kagi, D., Ledermann, B., Burki, K., Seiler, P., Odermatt, B., Olsen, K. J., Podack, E. R., Zinkernagel, R. M., and Hengartner, H. (1994). Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature* *369*, 31-37.
- Kam, C. M., Hudig, D., and Powers, J. C. (2000). Granzymes (lymphocyte serine proteases): characterization with natural and synthetic substrates and inhibitors. *Biochim Biophys Acta* *1477*, 307-323.

- Kapust, R. B., and Waugh, D. S. (1999). Escherichia coli maltose-binding protein is uncommonly effective at promoting the solubility of polypeptides to which it is fused. *Protein Sci* 8, 1668-1674.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., and Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26, 239-257.
- Khuri, F. R., Nemunaitis, J., Ganly, I., Arseneau, J., Tannock, I. F., Romel, L., Gore, M., Ironside, J., MacDougall, R. H., Heise, C., *et al.* (2000). a controlled trial of intratumoral ONYX-015, a selectively-replicating adenovirus, in combination with cisplatin and 5-fluorouracil in patients with recurrent head and neck cancer. *Nat Med* 6, 879-885.
- Kipriyanov, S. M., Breitling, F., Little, M., and Dubel, S. (1995). Single-chain antibody streptavidin fusions: tetrameric bifunctional scFv-complexes with biotin binding activity and enhanced affinity to antigen. *Hum Antibodies Hybridomas* 6, 93-101.
- Kipriyanov, S. M., Little, M., Kropshofer, H., Breitling, F., Gotter, S., and Dubel, S. (1996). Affinity enhancement of a recombinant antibody: formation of complexes with multiple valency by a single-chain Fv fragment-core streptavidin fusion. *Protein Eng* 9, 203-211.
- Kirkin, V., Joos, S., and Zörnig, M. (2004). The role of Bcl-2 family members in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1644, 229-249.
- Kischkel, F. C., Hellbardt, S., Behrmann, I., Germer, M., Pawlita, M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1995). Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *Embo J* 14, 5579-5588.
- Klein, J. A., Longo-Guess, C. M., Rossmann, M. P., Seburn, K. L., Hurd, R. E., Frankel, W. N., Bronson, R. T., and Ackerman, S. L. (2002). The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature* 419, 367-374.
- Koomagi, R., and Volm, M. (2000). Relationship between the expression of caspase-3 and the clinical outcome of patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 20, 493-496.
- Kostova, Z., and Wolf, D. H. (2003). For whom the bell tolls: protein quality control of the endoplasmic reticulum and the ubiquitin-proteasome connection. *Embo J* 22, 2309-2317.
- Kounnas, M. Z., Morris, R. E., Thompson, M. R., FitzGerald, D. J., Strickland, D. K., and Saelinger, C. B. (1992). The alpha 2-macroglobulin receptor/low density lipoprotein receptor-related protein binds and internalizes Pseudomonas exotoxin A. *J Biol Chem* 267, 12420-12423.
- Krammer, P. H. (2000). CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Kreitman, R. J. (2003). Recombinant toxins for the treatment of cancer. *5*, 44-51.
- Kreitman, R. J., Wilson, W. H., White, J. D., Stetler-Stevenson, M., Jaffe, E. S., Giardina, S., Waldmann, T. A., and Pastan, I. (2000). Phase I trial of recombinant immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38 (LMB-2) in patients with hematologic malignancies. *J Clin Oncol* 18, 1622-1636.
- Kroemer, G., and Reed, J. C. (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6, 513-519.
- Krueger, A., Baumann, S., Krammer, P. H., and Kirchhoff, S. (2001). FLICE-inhibitory proteins: regulators of death receptor-mediated apoptosis. *Mol Cell Biol* 21, 8247-8254.
- Krysan, D. J., Rockwell, N. C., and Fuller, R. S. (1999). Quantitative characterization of furin specificity. Energetics of substrate discrimination using an internally consistent set of hexapeptidyl methylcoumarinamides. *J Biol Chem* 274, 23229-23234.
- Kurschus, F. C., Kleinschmidt, M., Fellows, E., Dornmair, K., Rudolph, R., Lilie, H., and Jenne, D. E. (2004). Killing of target cells by redirected granzyme B in the absence of perforin. *FEBS Lett* 562, 87-92.
- Lassus, P., Opitz-Araya, X., and Lazebnik, Y. (2002). Requirement for caspase-2 in stress-induced apoptosis before mitochondrial permeabilization. *Science* 297, 1352-1354.
- LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F., and McCoy, J. M. (1993). A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the E. coli cytoplasm. *Biotechnology (N Y)* 11, 187-193.
- LeBlanc, H. N., and Ashkenazi, A. (2003). Apo2L/TRAIL and its death and decoy receptors. *Cell Death Differ* 10, 66-75.

- Leifert, J. A., Harkins, S., and Whitton, J. L. (2002). Full-length proteins attached to the HIV tat protein transduction domain are neither transduced between cells, nor exhibit enhanced immunogenicity. *Gene Ther* 9, 1422-1428.
- Li, L. Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.
- Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S. M., Ahmad, M., Alnemri, E. S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.
- Lieberman, J., and Fan, Z. (2003). Nuclear war: the granzyme A-bomb. *Curr Opin Immunol* 15, 553-559.
- Liu, T. J., Zhang, W. W., Taylor, D. L., Roth, J. A., Goepfert, H., and Clayman, G. L. (1994). Growth suppression of human head and neck cancer cells by the introduction of a wild-type p53 gene via a recombinant adenovirus. *Cancer Res* 54, 3662-3667.
- Liu, Y., Cheung, L. H., Hittelman, W. N., and Rosenblum, M. G. (2003a). Targeted delivery of human pro-apoptotic enzymes to tumor cells: In vitro studies describing a novel class of recombinant highly cytotoxic agents. *Mol Cancer Ther* 2, 1341-1350.
- Liu, Y., Cheung, L. H., Thorpe, P., and Rosenblum, M. G. (2003b). Mechanistic studies of a novel human fusion toxin composed of vascular endothelial growth factor (VEGF)121 and the serine protease granzyme B: directed apoptotic events in vascular endothelial cells. *Mol Cancer Ther* 2, 949-959.
- Lockshin, R. A. (2004). When cells die II - A comprehensive evaluation of apoptosis and programmed cell death. Wiley-Liss.
- Lockshin, R. A., and Williams, C. M. (1964). Programmed cell death. II: Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J Insect Physiol* 10, 643.
- Lockshin, R. A., and Zakeri, Z. (2004). Caspase-independent cell death? *Oncogene* 23, 2766-2773.
- Locksley, R. M., Killeen, N., and Lenardo, M. J. (2001). The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell* 104, 487-501.
- Loeffler, M., Daugas, E., Susin, S. A., Zamzami, N., Metivier, D., Nieminen, A. L., Brothers, G., Penninger, J. M., and Kroemer, G. (2001). Dominant cell death induction by extramitochondrially targeted apoptosis-inducing factor. *Faseb J* 15, 758-767.
- Lorenzo, H. K., Susin, S. A., Penninger, J., and Kroemer, G. (1999). Apoptosis inducing factor (AIF): a phylogenetically old, caspase-independent effector of cell death. *Cell Death Differ* 6, 516-524.
- Mahrus, S., Kisiel, W., and Craik, C. S. (2004). Granzyme M is a regulatory protease that inactivates proteinase inhibitor 9, an endogenous inhibitor of granzyme B. *J Biol Chem*.
- Martin, S. (2003). Caspase activation and the demolition phase of apoptosis. Conference Apoptosis 2003: From signaling pathways to therapeutic tools, Luxembourg, 291-122003.
- Massague, J., and Pandiella, A. (1993). Membrane-anchored growth factors. *Annu Rev Biochem* 62, 515-541.
- Maurer-Gebhard, M., Schmidt, M., Azemar, M., Altenschmidt, U., Stocklin, E., Wels, W., and Groner, B. (1998). Systemic treatment with a recombinant erbB-2 receptor-specific tumor toxin efficiently reduces pulmonary metastases in mice injected with genetically modified carcinoma cells. *Cancer Res* 58, 2661-2666.
- Maurer-Gebhard, M., Schmidt, M., Azemar, M., Stocklin, E., Wels, W., and Groner, B. (1999). A novel animal model for the evaluation of the efficacy of drugs directed against the ErbB2 receptor on metastasis formation. *Hybridoma* 18, 69-75.
- McGuire, M. J., Lipsky, P. E., and Thiele, D. L. (1993). Generation of active myeloid and lymphoid granule serine proteases requires processing by the granule thiol protease dipeptidyl peptidase I. *J Biol Chem* 268, 2458-2467.
- Medema, J. P., Schuurhuis, D. H., Rea, D., van Tongeren, J., de Jong, J., Bres, S. A., Laban, S., Toes, R. E., Toebes, M., Schumacher, T. N., et al. (2001). Expression of the serpin serine protease inhibitor 6 protects dendritic cells from cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis: differential modulation by T helper type 1 and type 2 cells. *J Exp Med* 194, 657-667.
- Medema, J. P., Toes, R. E., Scaffidi, C., Zheng, T. S., Flavell, R. A., Melief, C. J., Peter, M. E., Offringa, R., and Krammer, P. H. (1997). Cleavage of FLICE (caspase-8) by granzyme B during cytotoxic T lymphocyte-induced apoptosis. *Eur J Immunol* 27, 3492-3498.

- Meergans, T., Hildebrandt, A. K., Horak, D., Haenisch, C., and Wendel, A. (2000). The short prodomain influences caspase-3 activation in HeLa cells. *Biochem J* 349, 135-140.
- Mendelsohn, J. (2002). Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol* 20, 1S-13S.
- Mendelsohn, J. (2003). Antibody-mediated EGF receptor blockade as an anticancer therapy: from the laboratory to the clinic. *Cancer Immunol Immunother* 52, 342-346.
- Metkar, S. S., Wang, B., Aguilar-Santelises, M., Raja, S. M., Uhlin-Hansen, L., Podack, E., Trapani, J. A., and Froelich, C. J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis: perforin delivers granzyme B-serglycin complexes into target cells without plasma membrane pore formation. *Immunity* 16, 417-428.
- Michael, D., and Oren, M. (2002). The p53 and Mdm2 families in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 12, 53-59.
- Micheau, O., Thome, M., Schneider, P., Holler, N., Tschoep, J., Nicholson, D. W., Briand, C., and Grutter, M. G. (2002). The long form of FLIP is an activator of caspase-8 at the Fas death-inducing signaling complex. *J Biol Chem* 277, 45162-45171.
- Miramar, M. D., Costantini, P., Ravagnan, L., Saraiva, L. M., Haouzi, D., Brothers, G., Penninger, J. M., Peleato, M. L., Kroemer, G., and Susin, S. A. (2001). NADH oxidase activity of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *J Biol Chem* 276, 16391-16398.
- Modi, S., and Seidman, A. D. (2002). An update on epidermal growth factor receptor inhibitors. *Curr Oncol Rep* 4, 47-55.
- Morimoto, H., and Bonavida, B. (1992). Diphtheria toxin- and Pseudomonas A toxin-mediated apoptosis. ADP ribosylation of elongation factor-2 is required for DNA fragmentation and cell lysis and synergy with tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149, 2089-2094.
- Motyka, B., Korbitt, G., Pinkoski, M. J., Heibin, J. A., Caputo, A., Hobman, M., Barry, M., Shostak, I., Sawchuk, T., Holmes, C. F., *et al.* (2000). Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* 103, 491-500.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K., and Schäfer-Korting, M. (2001). Mutschler Arzneimittelwirkungen Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Vol 8 (Stuttgart, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft).
- Muzio, M., Chinnaiyan, A. M., Kischkel, F. C., O'Rourke, K., Shevchenko, A., Ni, J., Scaffidi, C., Bretz, J. D., Zhang, M., Gentz, R., *et al.* (1996). FLICE, a novel FADD-homologous ICE/CED-3-like protease, is recruited to the CD95 (Fas/APO-1) death-inducing signaling complex. *Cell* 85, 817-827.
- Nagahara, H., Vocero-Akbani, A. M., Snyder, E. L., Ho, A., Latham, D. G., Lissy, N. A., Becker-Hapak, M., Ezhevsky, S. A., and Dowdy, S. F. (1998). Transduction of full-length TAT fusion proteins into mammalian cells: TAT-p27Kip1 induces cell migration. *Nat Med* 4, 1449-1452.
- Nagata, S. (1996). Fas ligand and immune evasion. *Nat Med* 2, 1306-1307.
- Nagata, S. (1997). Apoptosis by death factor. *Cell* 88, 355-365.
- Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res* 256, 12-18.
- Nakamura, K., Arahata, K., Ishiura, S., Osame, M., and Sugita, H. (1993). Degradative activity of granzyme A on skeletal muscle proteins in vitro: a possible molecular mechanism for muscle fiber damage in polymyositis. *Neuromuscul Disord* 3, 303-310.
- Nechushtan, A., Smith, C. L., Hsu, Y. T., and Youle, R. J. (1999). Conformation of the Bax C-terminus regulates subcellular location and cell death. *Embo J* 18, 2330-2341.
- Nicholson, D. W. (1999). Caspase structure, proteolytic substrates, and function during apoptotic cell death. *Cell Death Differ* 6, 1028-1042.
- Nowell, P. C. (1976). The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194, 23-28.
- Nygren, P. A., Stahl, S., and Uhlen, M. (1994). Engineering proteins to facilitate bioprocessing. *Trends Biotechnol* 12, 184-188.
- Ogiso, H., Ishitani, R., Nureki, O., Fukai, S., Yamanaka, M., Kim, J. H., Saito, K., Sakamoto, A., Inoue, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2002). Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110, 775-787.

- Onda, M., Willingham, M., Wang, Q. C., Kreitman, R. J., Tsutsumi, Y., Nagata, S., and Pastan, I. (2000). Inhibition of TNF- α produced by Kupffer cells protects against the nonspecific liver toxicity of immunotoxin anti-Tac(Fv)-PE38, LMB-2. *J Immunol* 165, 7150-7156.
- Oren, M. (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death Differ* 10, 431-442.
- Pai-Scherf, L. H., Villa, J., Pearson, D., Watson, T., Liu, E., Willingham, M. C., and Pastan, I. (1999). Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin Cancer Res* 5, 2311-2315.
- Pan, G., Ni, J., Wei, Y. F., Yu, G., Gentz, R., and Dixit, V. M. (1997). An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science* 277, 815-818.
- Pardo, J., Bosque, A., Brehm, R., Wallich, R., Naval, J., Mullbacher, A., Anel, A., and Simon, M. M. (2004). Apoptotic pathways are selectively activated by granzyme A and/or granzyme B in CTL-mediated target cell lysis. *J Cell Biol* 167, 457-468.
- Pastan, I. (2003). Immunotoxins containing *Pseudomonas* exotoxin A: a short history. *Cancer Immunol Immunother* 52, 338-341.
- Pearce, L. A., Oddie, G. W., Coia, G., Kortt, A. A., Hudson, P. J., and Lilley, G. G. (1997). Linear gene fusions of antibody fragments with streptavidin can be linked to biotin labelled secondary molecules to form bispecific reagents. *Biochem Mol Biol Int* 42, 1179-1188.
- Peitsch, M. C., and Tschopp, J. (1994). Granzyme B. *Methods Enzymol* 244, 80-87.
- Perez, E. A., and Rodeheffer, R. (2004). Clinical cardiac tolerability of trastuzumab. *J Clin Oncol* 22, 322-329.
- Pham, C. T., and Ley, T. J. (1997). The role of granzyme B cluster proteases in cell-mediated cytotoxicity. *Semin Immunol* 9, 127-133.
- Pham, C. T., and Ley, T. J. (1999). Dipeptidyl peptidase I is required for the processing and activation of granzymes A and B in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 8627-8632.
- Pinkoski, M. J., Heibein, J. A., Barry, M., and Bleackley, R. C. (2000). Nuclear translocation of granzyme B in target cell apoptosis. *Cell Death Differ* 7, 17-24.
- Pinkoski, M. J., Hobman, M., Heibein, J. A., Tomaselli, K., Li, F., Seth, P., Froelich, C. J., and Bleackley, R. C. (1998). Entry and trafficking of granzyme B in target cells during granzyme B-perforin-mediated apoptosis. *Blood* 92, 1044-1054.
- Pinkoski, M. J., Waterhouse, N. J., Heibein, J. A., Wolf, B. B., Kuwana, T., Goldstein, J. C., Newmeyer, D. D., Bleackley, R. C., and Green, D. R. (2001). Granzyme B-mediated apoptosis proceeds predominantly through a Bcl-2-inhibitable mitochondrial pathway. *J Biol Chem* 276, 12060-12067.
- Poe, M., Blake, J. T., Boulton, D. A., Gammon, M., Sigal, N. H., Wu, J. K., and Zweerink, H. J. (1991). Human cytotoxic lymphocyte granzyme B. Its purification from granules and the characterization of substrate and inhibitor specificity. *J Biol Chem* 266, 98-103.
- Power, R. F., Conneely, O. M., McDonnell, D. P., Clark, J. H., Butt, T. R., Schrader, W. T., and O'Malley, B. W. (1990). High level expression of a truncated chicken progesterone receptor in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 265, 1419-1424.
- Powers, J. C., and Kam, C. M. (1995). Peptide thioester substrates for serine peptidases and metalloendopeptidases. *Methods Enzymol* 248, 3-18.
- Proba, K., Ge, L., and Pluckthun, A. (1995). Functional antibody single-chain fragments from the cytoplasm of *Escherichia coli*: influence of thioredoxin reductase (TrxB). *Gene* 159, 203-207.
- Pryor, K. D., and Leiting, B. (1997). High-level expression of soluble protein in *Escherichia coli* using a His6-tag and maltose-binding-protein double-affinity fusion system. *Protein Expr Purif* 10, 309-319.
- Puthalakath, H., and Strasser, A. (2002). Keeping killers on a tight leash: transcriptional and post-translational control of the pro-apoptotic activity of BH3-only proteins. *Cell Death Differ* 9, 505-512.
- Quan, L. T., Tewari, M., O'Rourke, K., Dixit, V., Snipas, S. J., Poirier, G. G., Ray, C., Pickup, D. J., and Salvesen, G. S. (1996). Proteolytic activation of the cell death protease Yama/CPP32 by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 1972-1976.

- Raja, S. M., Wang, B., Dantuluri, M., Desai, U. R., Demeler, B., Spiegel, K., Metkar, S. S., and Froelich, C. J. (2002). Cytotoxic cell granule-mediated apoptosis. Characterization of the macromolecular complex of granzyme B with serglycin. *J Biol Chem* 277, 49523-49530.
- Ravagnan, L., Gurbuxani, S., Susin, S. A., Maisse, C., Daugas, E., Zamzami, N., Mak, T., Jaattela, M., Penninger, J. M., Garrido, C., and Kroemer, G. (2001). Heat-shock protein 70 antagonizes apoptosis-inducing factor. *Nat Cell Biol* 3, 839-843.
- Read, S. H., Baliga, B. C., Ekert, P. G., Vaux, D. L., and Kumar, S. (2002). A novel Apaf-1-independent putative caspase-2 activation complex. *J Cell Biol* 159, 739-745.
- Robertson, J. D., Enoksson, M., Suomela, M., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Caspase-2 acts upstream of mitochondria to promote cytochrome c release during etoposide-induced apoptosis. *J Biol Chem* 277, 29803-29809.
- Robertson, J. D., Gogvadze, V., Kropotov, A., Vakifahmetoglu, H., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2004). Processed caspase-2 can induce mitochondria-mediated apoptosis independently of its enzymatic activity. *EMBO Rep* 5, 643-648.
- Rockwell, N. C., and Thorner, J. W. (2004). The kindest cuts of all: crystal structures of Kex2 and furin reveal secrets of precursor processing. *Trends Biochem Sci* 29, 80-87.
- Rodriguez, J., and Lazebnik, Y. (1999). Caspase-9 and APAF-1 form an active holoenzyme. *Genes Dev* 13, 3179-3184.
- Rohrbach, F., Gerstmayer, B., Biburger, M., and Wels, W. (2000). Construction and characterization of bispecific costimulatory molecules containing a minimized CD86 (B7-2) domain and single-chain antibody fragments for tumor targeting. *Clin Cancer Res* 6, 4314-4322.
- Rohrbach, F., Weth, R., Kursar, M., Sloots, A., Mittrücker, H.-W., and Wels, W. S. (2005). Targeted delivery of the ErbB2/HER2 tumor antigen to professional antigen presenting cells results in effective antitumor immunity. *J Immunol*, (in press).
- Romanos, M. A., Scorer, C. A., and Clare, J. J. (1992). Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 8, 423-488.
- Roy, S., and Nicholson, D. W. (2000). Cross-talk in cell death signaling. *J Exp Med* 192, 21-26.
- Russell, J. H., and Ley, T. J. (2002). Lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Annu Rev Immunol* 20, 323-370.
- Sakahira, H., Enari, M., and Nagata, S. (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature* 391, 96-99.
- Sakahira, H., Iwamatsu, A., and Nagata, S. (2000). Specific chaperone-like activity of inhibitor of caspase-activated DNase for caspase-activated DNase. *J Biol Chem* 275, 8091-8096.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19, 183-232.
- Salvesen, G. S., and Dixit, V. M. (1999). Caspase activation: the induced-proximity model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 10964-10967.
- Salvesen, G. S., and Duckett, C. S. (2002). IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 401-410.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Samuelsson, E., Moks, T., Nilsson, B., and Uhlen, M. (1994). Enhanced in vitro refolding of insulin-like growth factor I using a solubilizing fusion partner. *Biochemistry* 33, 4207-4211.
- Sarin, A., Williams, M. S., Alexander-Miller, M. A., Berzofsky, J. A., Zacharchuk, C. M., and Henkart, P. A. (1997). Target cell lysis by CTL granule exocytosis is independent of ICE/Ced-3 family proteases. *Immunity* 6, 209-215.
- Sartorius, U., Schmitz, I., and Krammer, P. H. (2001). Molecular mechanisms of death-receptor-mediated apoptosis. *ChemBiochem* 2, 20-29.
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., Debatin, K. M., Krammer, P. H., and Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *Embo J* 17, 1675-1687.
- Schlessinger, J. (2002). Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. *Cell* 110, 669-672.

- Schmidt, M., Hynes, N. E., Groner, B., and Wels, W. (1996). A bivalent single-chain antibody-toxin specific for ErbB-2 and the EGF receptor. *Int J Cancer* 65, 538-546.
- Schmidt, M., Maurer-Gebhard, M., Groner, B., Kohler, G., Brochmann-Santos, G., and Wels, W. (1999). Suppression of metastasis formation by a recombinant single chain antibody-toxin targeted to full-length and oncogenic variant EGF receptors. *Oncogene* 18, 1711-1721.
- Schmidt, M., Vakalopoulou, E., Schneider, D. W., and Wels, W. (1997). Construction and functional characterization of scFv(14E1)-ETA - a novel, highly potent antibody-toxin specific for the EGF receptor. *Br J Cancer* 75, 1575-1584.
- Schmidt, M., and Wels, W. (1996). Targeted inhibition of tumour cell growth by a bispecific single-chain toxin containing an antibody domain and TGF alpha. *Br J Cancer* 74, 853-862.
- Schmidt, M., and Wels, W. (2002). Replacement of N-terminal portions of TGF-alpha with corresponding heregulin sequences affects ligand-induced receptor signaling and intoxication of tumor cells by chimeric growth-factor toxins. *Int J Cancer* 97, 349-356.
- Schmiedl, A., Breitling, F., Winter, C. H., Queitsch, I., and Dubel, S. (2000). Effects of unpaired cysteines on yield, solubility and activity of different recombinant antibody constructs expressed in *E. coli*. *J Immunol Methods* 242, 101-114.
- Schmitt, E., Parcellier, A., Gurbuxani, S., Cande, C., Hammann, A., Morales, M. C., Hunt, C. R., Dix, D. J., Kroemer, R. T., Giordanetto, F., *et al.* (2003). Chemosensitization by a non-apoptogenic heat shock protein 70-binding apoptosis-inducing factor mutant. *Cancer Res* 63, 8233-8240.
- Schultz, J., Lin, Y., Sanderson, J., Zuo, Y., Stone, D., Mallett, R., Wilbert, S., and Axworthy, D. (2000). A tetravalent single-chain antibody-streptavidin fusion protein for pretargeted lymphoma therapy. *Cancer Res* 60, 6663-6669.
- Sears, R. C., and Nevins, J. R. (2002). Signaling networks that link cell proliferation and cell fate. *J Biol Chem* 277, 11617-11620.
- Sharif-Askari, E., Alam, A., Rheume, E., Beresford, P. J., Scotto, C., Sharma, K., Lee, D., DeWolf, W. E., Nuttall, M. E., Lieberman, J., and Sekaly, R. P. (2001). Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *Embo J* 20, 3101-3113.
- Shay, J. W., and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33, 787-791.
- Shen, Y., and White, E. (2001). p53-dependent apoptosis pathways. *Adv Cancer Res* 82, 55-84.
- Shi, L., Chen, G., MacDonald, G., Bergeron, L., Li, H., Miura, M., Rotello, R. J., Miller, D. K., Li, P., Seshadri, T., *et al.* (1996). Activation of an interleukin 1 converting enzyme-dependent apoptosis pathway by granzyme B. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 11002-11007.
- Shi, L., Kam, C. M., Powers, J. C., Aebersold, R., and Greenberg, A. H. (1992a). Purification of three cytotoxic lymphocyte granule serine proteases that induce apoptosis through distinct substrate and target cell interactions. *J Exp Med* 176, 1521-1529.
- Shi, L., Kraut, R. P., Aebersold, R., and Greenberg, A. H. (1992b). A natural killer cell granule protein that induces DNA fragmentation and apoptosis. *J Exp Med* 175, 553-566.
- Shi, L., Yang, X., Froelich, C. J., and Greenberg, A. H. (2000). Purification and use of granzyme B. *Methods Enzymol* 322, 125-143.
- Shi, Y. (2002). Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 9, 459-470.
- Shikama, Y., U, M., Miyashita, T., and Yamada, M. (2001). Comprehensive studies on subcellular localizations and cell death-inducing activities of eight GFP-tagged apoptosis-related caspases. *Exp Cell Res* 264, 315-325.
- Shresta, S., Graubert, T. A., Thomas, D. A., Raptis, S. Z., and Ley, T. J. (1999). Granzyme A initiates an alternative pathway for granule-mediated apoptosis. *Immunity* 10, 595-605.
- Shresta, S., MacIvor, D. M., Heusel, J. W., Russell, J. H., and Ley, T. J. (1995). Natural killer and lymphokine-activated killer cells require granzyme B for the rapid induction of apoptosis in susceptible target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5679-5683.
- Simon, M. M., Hausmann, M., Tran, T., Ebnet, K., Tschopp, J., ThaHla, R., and Mullbacher, A. (1997). In vitro- and ex vivo-derived cytolytic leukocytes from granzyme A x B double knockout mice are defective in granule-mediated apoptosis but not lysis of target cells. *J Exp Med* 186, 1781-1786.

- Simon, M. M., Kramer, M. D., Prester, M., and Gay, S. (1991). Mouse T-cell associated serine proteinase 1 degrades collagen type IV: a structural basis for the migration of lymphocytes through vascular basement membranes. *Immunology* 73, 117-119.
- Singh, R. K., Gutman, M., Bucana, C. D., Sanchez, R., Llansa, N., and Fidler, I. J. (1995). Interferons alpha and beta down-regulate the expression of basic fibroblast growth factor in human carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 4562-4566.
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A., and McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.
- Slamon, D. J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., *et al.* (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.
- Slee, E. A., Adrain, C., and Martin, S. J. (2001). Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276, 7320-7326.
- Sloots, A. (2004). Recombinant DNA-carrier proteins with improved intracellular trafficking capabilities for nonviral gene delivery. Dissertation, Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Smith, A., Waibel, R., Westera, G., Martin, A., Zimmerman, A. T., and Stahel, R. A. (1989). Immunolocalisation and imaging of small cell cancer xenografts by the IgG2a monoclonal antibody SWA11. *Br J Cancer* 59, 174-178.
- Smyth, M. J., McGuire, M. J., and Thia, K. Y. (1995). Expression of recombinant human granzyme B. A processing and activation role for dipeptidyl peptidase I. *J Immunol* 154, 6299-6305.
- Smyth, M. J., Sayers, T. J., Wiltout, T., Powers, J. C., and Trapani, J. A. (1993). Met-ase: cloning and distinct chromosomal location of a serine protease preferentially expressed in human natural killer cells. *J Immunol* 151, 6195-6205.
- Sorensen, H. P., Sperling-Petersen, H. U., and Mortensen, K. K. (2003). A favorable solubility partner for the recombinant expression of streptavidin. *Protein Expr Purif* 32, 252-259.
- Sower, L. E., Froelich, C. J., Allegretto, N., Rose, P. M., Hanna, W. D., and Klimpel, G. R. (1996a). Extracellular activities of human granzyme A. Monocyte activation by granzyme A versus alpha-thrombin. *J Immunol* 156, 2585-2590.
- Sower, L. E., Klimpel, G. R., Hanna, W., and Froelich, C. J. (1996b). Extracellular Activities of Human Granzymes. *Cell Immunol* 171, 159-163.
- Spicer, J. (2004). Technology evaluation: pertuzumab, Roche/Genentech/Chugai. *Curr Opin Mol Ther* 6, 337-343.
- Sporn, M. B. (1996). The war on cancer. *Lancet* 347, 1377-1381.
- Sreekrishna, K., Nelles, L., Potenz, R., Cruze, J., Mazzaferro, P., Fish, W., Fuke, M., Holden, K., Phelps, D., Wood, P., and *et al.* (1989). High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry* 28, 4117-4125.
- Srinivasula, S. M., Hegde, R., Saleh, A., Datta, P., Shiozaki, E., Chai, J., Lee, R. A., Robbins, P. D., Fernandes-Alnemri, T., Shi, Y., and Alnemri, E. S. (2001). A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature* 410, 112-116.
- Steller, H. (1995). Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science* 267, 1445-1449.
- Stennicke, H. R., Deveraux, Q. L., Humke, E. W., Reed, J. C., Dixit, V. M., and Salvesen, G. S. (1999). Caspase-9 can be activated without proteolytic processing. *J Biol Chem* 274, 8359-8362.
- Stennicke, H. R., and Salvesen, G. S. (2000). Caspases - controlling intracellular signals by protease zymogen activation. *Biochim Biophys Acta* 1477, 299-306.
- Strasser, A. (1999). Dr. Josef Steiner Cancer Research Prize Lecture: the role of physiological cell death in neoplastic transformation and in anti-cancer therapy. *Int J Cancer* 81, 505-511.
- Strasser, A., O'Connor, L., and Dixit, V. M. (2000). Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem* 69, 217-245.

- Suidan, H. S., Bouvier, J., Schaerer, E., Stone, S. R., Monard, D., and Tschopp, J. (1994). Granzyme A released upon stimulation of cytotoxic T lymphocytes activates the thrombin receptor on neuronal cells and astrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 8112-8116.
- Sun, J., Bird, C. H., Sutton, V., McDonald, L., Coughlin, P. B., De Jong, T. A., Trapani, J. A., and Bird, P. I. (1996). A cytosolic granzyme B inhibitor related to the viral apoptotic regulator cytokine response modifier A is present in cytotoxic lymphocytes. *J Biol Chem* *271*, 27802-27809.
- Susin, S. A., Lorenzo, H. K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B. E., Brothers, G. M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., *et al.* (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* *397*, 441-446.
- Susin, S. A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* *184*, 1331-1341.
- Sutton, V. R., Wowk, M. E., Cancilla, M., and Trapani, J. A. (2003). Caspase activation by granzyme B is indirect, and caspase autoprocessing requires the release of proapoptotic mitochondrial factors. *Immunity* *18*, 319-329.
- Suzuki, Y., Imai, Y., Nakayama, H., Takahashi, K., Takio, K., and Takahashi, R. (2001). A serine protease, HtrA2, is released from the mitochondria and interacts with XIAP, inducing cell death. *Mol Cell* *8*, 613-621.
- Svingen, P. A., Karp, J. E., Krajewski, S., Mesner, P. W., Jr., Gore, S. D., Burke, P. J., Reed, J. C., Lazebnik, Y. A., and Kaufmann, S. H. (2000). Evaluation of Apaf-1 and procaspases-2, -3, -7, -8, and -9 as potential prognostic markers in acute leukemia. *Blood* *96*, 3922-3931.
- Talanian, R. V., Yang, X., Turbov, J., Seth, P., Ghayur, T., Casiano, C. A., Orth, K., and Froelich, C. J. (1997). Granule-mediated killing: pathways for granzyme B-initiated apoptosis. *J Exp Med* *186*, 1323-1331.
- Teitz, T., Wei, T., Valentine, M. B., Vanin, E. F., Grenet, J., Valentine, V. A., Behm, F. G., Look, A. T., Lahti, J. M., and Kidd, V. J. (2000). Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* *6*, 529-535.
- Thomas, D. A., Du, C., Xu, M., Wang, X., and Ley, T. J. (2000). DFF45/ICAD can be directly processed by granzyme B during the induction of apoptosis. *Immunity* *12*, 621-632.
- Thomas, D. A., Scorrano, L., Putcha, G. V., Korsmeyer, S. J., and Ley, T. J. (2001). Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX, and BAK. *Proc Natl Acad Sci U S A* *98*, 14985-14990.
- Thorburn, A. (2004). Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal* *16*, 139-144.
- Thorburn, A., Thorburn, J., and Frankel, A. E. (2004). Induction of apoptosis by tumor cell-targeted toxins. *Apoptosis* *9*, 19-25.
- Thornberry, N. A. (1999). Caspases: a decade of death research. *Cell Death Differ* *6*, 1023-1027.
- Thornberry, N. A., and Lazebnik, Y. (1998). Caspases: enemies within. *Science* *281*, 1312-1316.
- Thornberry, N. A., Rano, T. A., Peterson, E. P., Rasper, D. M., Timkey, T., Garcia-Calvo, M., Houtzager, V. M., Nordstrom, P. A., Roy, S., Vaillancourt, J. P., *et al.* (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem* *272*, 17907-17911.
- Tinel, A., and Tschopp, J. (2004). The PIDosome, a protein complex implicated in activation of caspase-2 in response to genotoxic stress. *Science* *304*, 843-846.
- Trapani, J. A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* *2*, REVIEWS3014.
- Trapani, J. A., Jans, P., Smyth, M. J., Froelich, C. J., Williams, E. A., Sutton, V. R., and Jans, D. A. (1998). Perforin-dependent nuclear entry of granzyme B precedes apoptosis, and is not a consequence of nuclear membrane dysfunction. *Cell Death Differ* *5*, 488-496.
- Trapani, J. A., Sutton, V. R., Thia, K. Y., Li, Y. Q., Froelich, C. J., Jans, D. A., Sandrin, M. S., and Browne, K. A. (2003). A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J Cell Biol* *160*, 223-233.
- Tschopp, J., Irmeler, M., and Thome, M. (1998). Inhibition of fas death signals by FLIPs. *Curr Opin Immunol* *10*, 552-558.

- Tudyka, T., and Skerra, A. (1997). Glutathione S-transferase can be used as a C-terminal, enzymatically active dimerization module for a recombinant protease inhibitor, and functionally secreted into the periplasm of *Escherichia coli*. *Protein Sci* **6**, 2180-2187.
- Tzahar, E., Pinkas-Kramarski, R., Moyer, J. D., Klapper, L. N., Alroy, I., Levkowitz, G., Shelly, M., Henis, S., Eisenstein, M., Ratzkin, B. J., *et al.* (1997). Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network. *Embo J* **16**, 4938-4950.
- Tzahar, E., Waterman, H., Chen, X., Levkowitz, G., Karunagaran, D., Lavi, S., Ratzkin, B. J., and Yarden, Y. (1996). A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* **16**, 5276-5287.
- Uherek, C., Fominaya, J., and Wels, W. (1998). A modular DNA carrier protein based on the structure of diphtheria toxin mediates target cell-specific gene delivery. *J Biol Chem* **273**, 8835-8841.
- Uhlen, M., Forsberg, G., Moks, T., Hartmanis, M., and Nilsson, B. (1992). Fusion proteins in biotechnology. *Curr Opin Biotechnol* **3**, 363-369.
- Vahsen, N., Cande, C., Briere, J. J., Benit, P., Joza, N., Larochette, N., Mastroberardino, P. G., Pequignot, M. O., Casares, N., Lazar, V., *et al.* (2004). AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *Embo J*.
- Van de Craen, M., Van den Brande, I., Declercq, W., Irmier, M., Beyaert, R., Tschoop, J., Fiers, W., and Vandenabeele, P. (1997). Cleavage of caspase family members by granzyme B: a comparative study in vitro. *Eur J Immunol* **27**, 1296-1299.
- van Dongen, J. J., Macintyre, E. A., Gabert, J. A., Delabesse, E., Rossi, V., Saglio, G., Gottardi, E., Rambaldi, A., Dotti, G., Griesinger, F., *et al.* (1999). Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia* **13**, 1901-1928.
- van Loo, G., van Gurp, M., Depuydt, B., Srinivasula, S. M., Rodriguez, I., Alnemri, E. S., Gevaert, K., Vandekerckhove, J., Declercq, W., and Vandenabeele, P. (2002). The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. *Cell Death Differ* **9**, 20-26.
- Vanguri, P., Lee, E., Henkart, P., and Shin, M. L. (1993). Hydrolysis of myelin basic protein in myelin membranes by granzymes of large granular lymphocytes. *J Immunol* **150**, 2431-2439.
- Vecil, G. G., and Lang, F. F. (2003). Clinical trials of adenoviruses in brain tumors: a review of Ad-p53 and oncolytic adenoviruses. *J Neurooncol* **65**, 237-246.
- Verhagen, A. M., Ekert, P. G., Pakusch, M., Silke, J., Connolly, L. M., Reid, G. E., Moritz, R. L., Simpson, R. J., and Vaux, D. L. (2000). Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell* **102**, 43-53.
- Vettel, U., Bar-Shavit, R., Simon, M. M., Brunner, G., Vlodavsky, I., and Kramer, M. D. (1991). Coordinate secretion and functional synergism of T cell-associated serine proteinase-1 (MTSP-1) and endoglycosidase(s) of activated T cells. *Eur J Immunol* **21**, 2247-2251.
- Vocero-Akbani, A. M., Heyden, N. V., Lissy, N. A., Ratner, L., and Dowdy, S. F. (1999). Killing HIV-infected cells by transduction with an HIV protease-activated caspase-3 protein. *Nat Med* **5**, 29-33.
- Vogelstein, B., Lane, D., and Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**, 307-310.
- Volpert, O. V., Dameron, K. M., and Bouck, N. (1997). Sequential development of an angiogenic phenotype by human fibroblasts progressing to tumorigenicity. *Oncogene* **14**, 1495-1502.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K., and Scheurich, P. (2002). TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) and its receptors in tumor surveillance and cancer therapy. *Apoptosis* **7**, 449-459.
- Walczak, H., and Krammer, P. H. (2000). The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. *Exp Cell Res* **256**, 58-66.
- Wang, G. Q., Wieckowski, E., Goldstein, L. A., Gastman, B. R., Rabinovitz, A., Gambotto, A., Li, S., Fang, B., Yin, X. M., and Rabinowich, H. (2001). Resistance to granzyme B-mediated cytochrome c release in Bak-deficient cells. *J Exp Med* **194**, 1325-1337.
- Wang, X. (2001). The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **15**, 2922-2933.

- Wang, X., Yang, C., Chai, J., Shi, Y., and Xue, D. (2002). Mechanisms of AIF-mediated apoptotic DNA degradation in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 298, 1587-1592.
- Waterhouse, N. J., Clarke, C. J., Sedelies, K. A., Teng, M. W., and Trapani, J. A. (2004). Cytotoxic lymphocytes; instigators of dramatic target cell death. *Biochem Pharmacol* 68, 1033-1040.
- Waterhouse, N. J., Sedelies, K. A., Browne, K. A., Wowk, M. E., Newbold, A., Sutton, V. R., Clarke, C. J., Oliaro, J., Lindemann, R. K., Bird, P. I., *et al.* (2005). A central role for Bid in granzyme B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 280, 4476-4482.
- Weinberg, R. A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.
- Wels, W., Beerli, R., Hellmann, P., Schmidt, M., Marte, B. M., Kornilova, E. S., Hekele, A., Mendelsohn, J., Groner, B., and Hynes, N. E. (1995). EGF receptor and p185erbB-2-specific single-chain antibody toxins differ in their cell-killing activity on tumor cells expressing both receptor proteins. *Int J Cancer* 60, 137-144.
- Wels, W., Biburger, M., Müller, T., Dälken, B., Giesübel, U., Tonn, T., and Uherek, C. (2004). Recombinant immunotoxins and retargeted killer cells: employing engineered antibody fragments for tumor-specific targeting of cytotoxic effectors. *Cancer Immunol Immunother* 53, 217-226.
- Wels, W., Groner, B., and Hynes, N. E. (1996). Intervention in receptor tyrosine kinase-mediated pathways: recombinant antibody fusion proteins targeted to ErbB2. *Curr Top Microbiol Immunol* 213 (Pt 3), 113-128.
- Wels, W., Harwerth, I. M., Mueller, M., Groner, B., and Hynes, N. E. (1992). Selective inhibition of tumor cell growth by a recombinant single-chain antibody-toxin specific for the erbB-2 receptor. *Cancer Res* 52, 6310-6317.
- Yang, X., Stennicke, H. R., Wang, B., Green, D. R., Janicke, R. U., Srinivasan, A., Seth, P., Salvesen, G. S., and Froelich, C. J. (1998). Granzyme B mimics apical caspases. Description of a unified pathway for trans-activation of executioner caspase-3 and -7. *J Biol Chem* 273, 34278-34283.
- Yang, X. H., Sladek, T. L., Liu, X., Butler, B. R., Froelich, C. J., and Thor, A. D. (2001). Reconstitution of caspase 3 sensitizes MCF-7 breast cancer cells to doxorubicin- and etoposide-induced apoptosis. *Cancer Res* 61, 348-354.
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 37 Suppl 4, S3-8.
- Yarden, Y., and Slivkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 127-137.
- Ye, H., Cande, C., Stephanou, N. C., Jiang, S., Gurbuxani, S., Larochette, N., Daugas, E., Garrido, C., Kroemer, G., and Wu, H. (2002). DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol* 9, 680-684.
- Yoda, T., Terano, Y., Shimada, A., Suzuki, Y., Yamazaki, K., Sakon, N., Oishi, I., Utagawa, E. T., Okuno, Y., and Shibata, T. (2000). Expression of recombinant Norwalk-like virus capsid proteins using a bacterial system and the development of its immunologic detection. *J Med Virol* 60, 475-481.
- Young, J. D., Cohn, Z. A., and Podack, E. R. (1986). The ninth component of complement and the pore-forming protein (perforin 1) from cytotoxic T cells: structural, immunological, and functional similarities. *Science* 233, 184-190.
- Yu, S. W., Wang, H., Poitras, M. F., Coombs, C., Bowers, W. J., Federoff, H. J., Poirier, G. G., Dawson, T. M., and Dawson, V. L. (2002). Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science* 297, 259-263.
- Zenke, M., Steinlein, P., Wagner, E., Cotten, M., Beug, H., and Birnstiel, M. L. (1990). Receptor-mediated endocytosis of transferrin-polycation conjugates: an efficient way to introduce DNA into hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 3655-3659.
- Zhang, D., Beresford, P. J., Greenberg, A. H., and Lieberman, J. (2001a). Granzymes A and B directly cleave lamins and disrupt the nuclear lamina during granule-mediated cytotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 5746-5751.
- Zhang, D., Pasternack, M. S., Beresford, P. J., Wagner, L., Greenberg, A. H., and Lieberman, J. (2001b). Induction of rapid histone degradation by the cytotoxic T lymphocyte protease Granzyme A. *J Biol Chem* 276, 3683-3690.
- Zhang, X., Sawyer, G. J., Dong, X., Qiu, Y., Collins, L., and Fabre, J. W. (2003). The in vivo use of chloroquine to promote non-viral gene delivery to the liver via the portal vein and bile duct. *J Gene Med* 5, 209-218.

- Zhang, Y., Olsen, D. R., Nguyen, K. B., Olson, P. S., Rhodes, E. T., and Mascarenhas, D. (1998). Expression of eukaryotic proteins in soluble form in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif* 12, 159-165.
- Zhao, J., Zhang, L. H., Jia, L. T., Zhang, L., Xu, Y. M., Wang, Z., Yu, C. J., Peng, W. D., Wen, W. H., Wang, C. J., *et al.* (2004). Secreted antibody/granzyme B fusion protein stimulates selective killing of HER2-overexpressing tumor cells. *J Biol Chem* 279, 21343-21348.
- Zhivotovsky, B., Samali, A., Gahm, A., and Orrenius, S. (1999). Caspases: their intracellular localization and translocation during apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 644-651.
- Zimmermann, S., Wels, W., Froesch, B. A., Gerstmayer, B., Stahel, R. A., and Zangemeister-Wittke, U. (1997). A novel immunotoxin recognising the epithelial glycoprotein-2 has potent antitumoural activity on chemotherapy-resistant lung cancer. *Cancer Immunol Immunother* 44, 1-9.
- Zörnig, M., Hueber, A., Baum, W., and Evan, G. (2001). Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551, F1-37.

6 Abkürzungen und Einheiten

5-AIF	scFv(FRP5)-AIF Fusionsprotein
5-E-AIF	scFv(FRP5)-ETAII-AIF Fusionsprotein
A	Ampère (Stromstärke)
Abb.	Abbildung
Ac-DEVD-pNA	N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp- <i>p</i> -Nitroanilid
Ac-IETD-CHO	N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp-Aldehyd
Ac-IETD-pNA	N-Acetyl-Ile-Glu-Thr-Asp- <i>p</i> -Nitroanilid
AIF	engl. „apoptosis inducing factor“
α	α -Faktor Signalpeptid aus <i>S. cerevisiae</i>
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
bAP	biotinylierte Alkalische Phosphatase
bEGFP	biotinyliertes EGFP
bETA42	biotinyliertes ETA42
bGrB	biotinyliertes GrB
bp	Basenpaare
BSA	engl. „bovine serum albumine“
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	circa
CAD	engl. „caspase activated DNase“
CL	Cytotoxische Lymphocyten
CTL	Cytotoxische T-Lymphocyten
cDNA	engl. „complementary DNA“
CLSM	engl. „confocal laser scanning mikroskopie“
Cyt. <i>c</i>	Cytochrom <i>c</i>
DFF	engl. „DNA fragmentation factor“
d. h.	das heißt
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's Medium
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DT	Diphtherietoxin
DTT	Dithiothreitol
	Translokationsdomäne von Diphtherietoxin
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	„enhanced chemoluminescence“
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EGFP	engl. „enhanced green fluorescent protein“
EGF	engl. „epidermal growth factor“
EGFR	engl. „epidermal growth factor receptor“
ELISA	engl. „enzyme-linked immunosorbent assay“
Endo G	Endonuklease G
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ETA	Exotoxin A aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ETAII	Translokationsdomäne von Exotoxin A
ETA42	verkürzte Exotoxin A Variante, in der die Zellbindungsdomäne fehlt
F	Farad (Kapazität)
	FLAG-tag (Epitop des mAk M2 anti-FLAG)
FACS	engl. „fluorescence activated cell sorting“
fur	Erkennungssequenz der Endoprotease Furin (Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg)
furS	Erkennungssequenz der Endoprotease Furin (Arg-Ala-Arg-Tyr-Lys-Arg-Ser)
g	Erdbeschleunigung
	Gramm
GAPDH	Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase
GST	Gluthation S-Transferase aus <i>Schistosoma japonicum</i>
GrB	Granzym B

GrB-5	Granzym B-scFv(FRP5) Fusionsprotein
GrB-T	Granzym B-TGF α Fusionsprotein
h	Stunden
H	Hexahistidin-tag
HBS	engl. „Hepes buffered saline“
HIV	humanes Immunodefizienz-Virus
HRP	engl. „horse radish peroxidase“
ICAD	engl. „inhibitor of CAD“
IgG	Immunoglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
l	Liter
m	Meter
	milli (10^{-3})
M	molar (mol/Liter)
	Myc-tag, Epitop des mAk 9E10
MGV	engl. „mean gray values“
MBP	Maltose Bindungsprotein, engl. „maltose binding protein“ aus <i>E. coli</i>
MHC	engl. „major histocompatibility complex“
min	Minuten
mRNA	messenger RNA
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
μ	micro (10^{-6})
n	nano (10^{-9})
OD _x	optische Dichte bei der Wellenlänge x nm
ompA	Signalpeptid des „outer membrane protein A“ von <i>E. coli</i>
p	pico (10^{-12})
peB	Signalpeptid der „pectate lyase B“ von <i>Erwinia carotovora</i>
PI-9	Proteinase Inhibitor-9
<i>P. pastoris</i>	<i>Pichia pastoris</i>
PBS	engl. „phosphate buffered saline“
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	engl. „polymerase chain reaction“
PI	Propidiumjodid
R	Ohm (Widerstand)
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
S	Epitop des mAk Swa11
SA	core-Streptavidin
SA-5	Streptavidin-scFv(FRP5) Fusionsprotein
<i>S. cerevisia</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SA	Streptavidin
scFv	„single chain“ Antikörper
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl. sodium dodecyl sulphate)
sek	Sekunden
sog.	sogenannte/r/s
TBS	engl. „Tris buffered saline“
TEMED	N,N'-Tetramethyl-ethylen-diamin
TGF α	engl. „transforming growth factor α “
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Enzymaktivität)
V	Volt (Spannung)
v/v	engl. „volume per volume“
W	Watt (Leistung)
w/v	engl. „weight per volume“
z. T.	zum Teil
zVAD-fmk	Benzoyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-Fluormethylketon

Veröffentlichungen

Dälken, B., Giesübel, U., Knauer, S., Wels, WS. (2005). Targeted induction of apoptosis by chimeric granzyme B fusion proteins carrying antibody and growth factor domains for cell recognition
zur Veröffentlichung eingereicht

Giesübel, U., **Dälken, B.**, Wels, WS. (2005). Cell binding, internalization and cytotoxic activity of human granzyme B expressed in the yeast *Pichia pastoris*
zur Veröffentlichung eingereicht

Dälken, B., Giesübel, U., Wels, WS. (2005). Targeted delivery of apoptosis-inducing proteins to tumor cells by a streptavidin-scFv carrier protein
Manuskript in Vorbereitung

Wels W., Biburger, M., Müller, T., **Dälken, B.**, Giesübel, U., Tonn, T., Uhrek C. (2004).
Recombinant immunotoxins and retargeted killer cells: employing engineered antibody fragments for tumor-specific targeting of cytotoxic effectors
Cancer Immunol Immunother 53(3), 217-226.

Poster abstract

Dälken, B., Giesübel, U., Wels, W.
Chimeric granzyme B fusion proteins for targeted induction of apoptosis
Strategies For Immune Therapy
Würzburg, 28. Februar-3. März 2004

Patentanmeldung

Dälken, B., Wels, WS. Patentanmeldung zur Optimierung der Expression rekombinanter Proteine
in Vorbereitung

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Winfried Wels für die Möglichkeit, diese Arbeit in seiner Gruppe durchführen zu können, sowie für viele seiner Ideen, die in dieses Projekt eingeflossen sind.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Bernd Ludwig, der mich seitens der Johann Wolfgang Goethe-Universität betreute und während meines Studiums stets ein offenes Ohr für die Belange der Studenten hatte.

Alle derzeitigen und früheren Mitglieder der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winfried Wels (Tina Müller, Dr. Arjen Sloots, Thorsten Geyer, Hayat Mahmud, Dr. Florian Rohrbach, Cord Hartmann, Dr. Stephen Hyland, Dr. Robert Weth, Dr. Ulrike Giesübel, Dr. Markus Biburger, Barbara Uherek, Dr. Christoph Uherek) schufen stets eine angenehme Arbeitsatmosphäre und standen mir immer mit Ratschlägen zur Seite. Besonders danke ich Dr. Ulrike Giesübel, die durch viele Diskussionen und Ideen zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen hat. Cord Hartmann danke ich für die Unterstützung bei der Fertigstellung von Manuskripten und für viele hilfreiche Vorschläge zu meiner Arbeit. Dr. Martin Zörnig gilt mein Dank für seine Ratschläge und sein Interesse an meinem Projekt.

Thea Müller-Kuller, Gianni Capalbo und Shirley Knauer möchte ich für Ihre technische Unterstützung bei quantitativen PCR-Analysen und Mikroinjektionsexperimenten danken.

Ein besonderer Dank gilt Heike, meinen Eltern und meinem Bruder, die mich stets unterstützt haben.

Lebenslauf



Zur Person

Name: Benjamin Dälken
Geburtstag: 29.12.1975
Geburtsort: Georgsmarienhütte

Schule

1988-1995 Gymnasium Oesede, Georgsmarienhütte

Wehrdienst

1995-1996 12./LwAusbRgt 1, Heide; LwÜbn-/LwMatDp 21, Diepholz

Studium

10.1996-04.2001 Studium der Biochemie an der Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt am Main

10.2000-04.2001 Diplomarbeit am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winfried Wels

„Konstruktion und Charakterisierung rekombinanter Caspasederivate zur Aufnahme in Tumorzellen“

04.2001 Diplom-Biochemiker-Hauptprüfung mit Nebenfach Pharmakologie und Toxikologie

seit 06.2001 Dissertation am Chemotherapeutischen Forschungsinstitut Georg-Speyer-Haus in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Winfried Wels

Akademische Lehrer: E. Bamberg, J. Bereiter-Hahn, E. Egert, J. Engels, K.-D. Entian, H. Fasold, J. Feierabend, K. Fendler, U. Gerhardt, C. Griesinger, U. Günther, B. Kolbesen, A. Kröger, G. Lambrecht, B. Ludwig, H. Michel, W. Müller, W. Pläßmann, R. Prinzing, J. Rheinlaender, H. Rüterjans, R. Schmidt, J. Soppa, H. Steiger, W. Wels, C. Winter, H. Zimmermann

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt habe, und daß keine weiteren Hilfsmittel und Quellen als die hier aufgeführten verwendet worden sind. Die Arbeit hat in gleicher Weise noch keiner Prüfungsbehörde vorgelegen.

Frankfurt am Main, April 2005

Benjamin Dälken